

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Lukáš Taraba

ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN V PRŮMYSL OVÝCH ROZTOCÍCH

Electrophoretic Determination of Organic Acids
in Industrial Solutions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. května 2014.

Abstrakt

Tato práce se věnuje vývoji a optimalizaci podmínek úpravy vzorků dvou průmyslových pokovovacích roztoků obsahujících chromité ionty a kyselinu šťavelovou, maleinovou, octovou nebo citronovou a jejich následné elektroforetické analýze. Pro simulaci složité matrice reálných lázní byly připraveny modelové roztoky obsahující složky směsi o známé koncentraci. V rámci hledání předúpravy směsi zajišťující maximální účinnost vyvázání kyselin z jejich stabilních komplexů s chromitými ionty bylo testováno různé naředění roztoku a aplikace fluoridových, hydroxidových a EDTA aniontů jakožto vyvazujících činidel. Stanovení příslušných organických kyselin bylo provedeno technikou kapilární zónové elektroforézy s nepřímou UV detekcí při 350 nm s referencí při 230 nm. K separaci analytů byl použit komerčně dostupný základní elektrolyt určený k analýze pokovovacích roztoků (pH = 5,7). Jako nejvhodnější způsob vyvázání kyselin se ukázalo vysrážení chromitých iontů hydroxidem. Ke kvantifikaci byla použita metoda standardního přídatku. Koncentrace šťavelanu a citrátu v reálném vzorku odpovídala 96,50 % (SD = 0,71 %), respektive 97,53 % (SD = 0,79 %) deklarovaného množství. Při testování opakovatelnosti metody ($n = 5$) byla RSD migračních časů pro kyselinu citronovou i šťavelovou nižší než 0,51 %, RSD plochy píků šťavelanového aniontu byla 5,15 % pro citrát pak 2,95 %. Stanovení obsahu kyseliny maleinové a octové nebylo z důvodu jejich nízkých koncentrací v reálném roztoku možné. Celkový čas jedné analýzy byl kratší než šest minut. Tato jednoduchá, nenáročná metoda je vhodná k rychlému rutinnímu stanovení kyseliny citronové a šťavelové v roztocích trojmocného chromu.

Klíčová slova

Předúprava vzorku, kapilární elektroforéza, nepřímá UV detekce, organické kyseliny, průmyslové roztoky

Abstract

This work deals with the development and optimization of conditions of pretreatment of two industrial surface finishing baths containing chromium(III) ions and oxalic, maleic, acetic or citric acid and their electrophoretic analysis. Some model mixtures containing known amounts of components of industrial solutions have been made for simulation of complex matrices of the real samples. Prior to analysis a sample pre-treatment consisting of different dilution and addition of fluoride, hydroxide or EDTA anions as suitable agent releasing acid out of the stable chromium complex were studied. Determination of organic anions was accomplished by indirect UV detection at 350 nm with a reference at 230 nm. A commercially available background electrolyte, pH 5.7, was used for separation of analytes. The most appropriate pre-treatment to release acids have been achieved by precipitation of chromium(III) hydroxide. The method of standard additions was used for the quantification. The concentrations of oxalate and citrate in the real samples were calculated as 96,50 % (S.D. = 0,71 %) and 97,53 % (S.D. = 0,79 %), respectively, of declared amount. Satisfactory repeatabilities were obtained for both analytes with R.S.D. values ($n = 5$) for migration times lower than 0,51 %, R.S.D. for peak areas of oxalic acid were 5,15 % and 2,95 % in case of citric acid. The determination of maleic and acetic acid was not possible due to their low concentrations in the real solution. Total analysis time less than six minutes was achieved. This simple inexpensive method is suitable for rapid routine determination of citric and oxalic acid in chromium(III)-based solutions.

Keywords

Sample pretreatment, capillary electrophoresis, indirect UV detection, organic acids, industrial solution

Poděkování

Velmi děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, zájem, vstřícnost a čas, který mi věnoval v průběhu tvorby této práce. Dále děkuji své rodině za její toleranci a všemožnou podporu během studia.

Obsah

Seznam zkratk.....	7
Seznam symbolů.....	8
1 Úvod	9
1.1 Galvanické pokovování.....	10
1.2 Chromovací lázně.....	11
1.3 Vývoj lázní na bázi redukce chromitých iontů.....	11
1.4 Pasivace konverzními povlaky.....	13
2 Cíl práce.....	14
3 Teoretická část.....	15
3.1 Metody chemické analýzy lázní.....	15
3.2 Kapilární zónová elektroforéza	16
3.2.1 Podmínky elektroforetické separace malých organických iontů	17
3.2.2 Možnosti detekce organických kyselin.....	19
4 Experimentální část	23
4.1 Popis vzorků.....	23
4.2 Použité chemikálie	23
4.3 Předúprava vzorku.....	24
4.4 Přístrojové vybavení.....	24
4.5 Parametry CZE analýzy	25
4.6 Identifikace a kvantifikace	25
5 Výsledky a diskuze.....	27
5.1 Příprava modelových směsí	27
5.1.1 Spektra modelových směsí stanovovaných kyselin.....	28
5.1.2 Aplikace komerčního pufru	30
5.2 Kyselina šťavelová - předúprava vzorku a stanovení	30
5.3 Kyselina citronová - předúprava vzorku a stanovení	40
5.4 Stanovení kyseliny maleinové a kyseliny octové.....	48
6 Závěr.....	51
Seznam literatury.....	52

Seznam zkratek

AC	octová kyselina
AEC	aniontově-výměnná chromatografie (anion-exchange chromatography)
BGE	základní, nosný elektrolyt, separační pufr (background electrolyte)
BTA	1,3,5-benzentrikarboxylová kyselina (1,3,5-benzenetricarboxylic acid)
CIT	citronová kyselina
CPSV	pulzní cyklická rozpouštěcí voltametrie (cyclic pulse stripping voltammetry)
CTAB	bromid cetyltrimethylamonia(1+)
CTAH	hydroxid cetyltrimethylamonia(1+)
CSV	cyklická rozpouštěcí voltametrie (cyclic stripping voltammetry)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detector)
DETA	diethylentriamin
DTAB	bromid dodecyltriethylamonia(1+)
EDTA	ethylendiammintetraoctová kyselina (ethylenediamminetetraacetic acid)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
EPA	Environmental Protection Agency
HTAH	hydroxid hexadecyltrimethylamonia(1+)
IC	iontová chromatografie (ion chromatography)
IEC	iontově vylučovací chromatografie (ion exclusion chromatography)
ITP	izotachoforéza (isotachophoresis)
MAL	maleinová kyselina
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
NDC	2,6-naftalendikarboxylová kyselina
OX	šťavelová kyselina
OX.2H ₂ O	dihydrát šťavelové kyseliny
PCGA	pulzní cyklická galvanostatická analýza (pulsed cyclic galvanostatic analysis)
PDC	2,6-pyridindikarboxylová kyselina
PL1	vzorek průmyslového roztoku 1

PL2	vzorek průmyslového roztoku 2
PVDF	poly(1,1-difluoroethylen)
RoHS	Restriction of Hazardous Substances – nařízení EU
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
TEPA	tetraethylenpentaamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTAB	bromid tetradecyltrimethylamonia(1+)
TTAH	hydroxid tetradecyltrimethylamonia(1+)
WEEE	Waste Electrical and Electronic Equipment – nařízení EU

Seznam symbolů

A_{peak}	plocha píku
F	podíl rozptylů
$F_{(4,4)}$	kritická hodnota jednostranného F-testu
n	počet měření
pH_{BGE}	pH separačního elektrolytu
$t_{\text{anal.}}$	celková doba analýzy
$t_{\text{mig.}}$	migrační čas analytu
α	hladina významnosti
β	kumulativní konstanta stability
η	účinnost vyvázání kyselin
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima

1 Úvod

Kovy, jak v podobě elementárních prvků, tak ve formě nejrůznějších chemických sloučenin, jsou neodlučitelnou a nepostradatelnou součástí našeho světa. Mají mnoho zcela výjimečných předností (vysoká teplota tání a varu, elektrická a tepelná vodivost, tažnost a kujnost), pro které jsou lidstvem již několik tisíc let hojně zpracovávány a užívány. Některé z nich mají ovšem díky své fyzikálně chemické podstatě i některé méně vhodné vlastnosti, kupříkladu mohou za jistých podmínek korodovat. Existují samozřejmě ušlechtilé kovy a speciálně vyvinuté slitiny, které jsou značně odolné a prakticky stále při jakýchkoli atmosférických podmínkách či v prostředí extrémně reaktivních roztoků, jejich aplikace v širokém měřítku je však ekonomicky velmi náročná a pro běžné účely, třeba při výrobě karoserií aut nebo spotřební elektrotechniky, nesmyslná.

Z těchto důvodů se při průmyslovém zpracování kovů využívá technologie povrchové úpravy. Při tzv. povlakování¹ dochází k pokrytí obyčejných kovových objektů povlakem nějakého jiného (obvykle ušlechtilejšího) kovu, případně jejich slitinami, kompozity nebo i zcela nekovovými materiály, často ve více odlišných vrstvách, přičemž velikost, tvar a složitost struktury objektu nejsou limitujícími faktory.

Podle účelu lze rozlišit tři základní skupiny povrchové úpravy, do první patří primární antikorozi ochrana, ve druhé je požadováno i dosažení dalších speciálních vlastností povrchu a do poslední spadá dosažení požadovaného vzhledu. Speciálními vlastnostmi se myslí kupříkladu ořezuvzdornost, tvrdost, elasticita, kluznost, katalytická schopnost, žáruvzdornost či elektrická vodivost.

Z nekovových povlaků jsou široce používány anorganické smalty, cementy a konverzní vrstvy², z organických pak nátěry, pryže a plasty vytvářející kompaktní filmy³. Nejvíce používanými kovy jsou Zn, Ni, Al, Cu a Cr.

Kovové povlaky či vrstvy lze na podkladovém materiálu, nejčastěji jiném kovu, vytvořit několika způsoby. Mechanicky se různé materiály spojují například plátováním a válcováním, vytvořené vrstvy mají obvykle tloušťku několika milimetrů. Mezi fyzikální varianty zpracování patří vakuová depozice, metalizace (žárové stříkání kovů)⁴ a ponor v roztavených kovech. Výsledná tloušťka nanesených povlaků je velmi variabilní, pohybuje se od setin po stovky mikrometrů.

U chemické a elektrochemické úpravy⁵ se používají dva způsoby v závislosti na

operační teplotě. Při vysokoteplotním postupu, kdy teplota dosahuje i 1000 °C je původní materiál vystaven účinkům par nebo tavenině solí nanášeného kovu. Nejprve dochází k uvolnění difundujícího kovu redukcí jeho sloučeniny či jejím tepelným rozkladem a následně ke vzniku termodifúzní vrstvy.

U nízkoteplotního procesu, v přibližném teplotním rozmezí 20 - 100 °C, se povlak vylučuje buď v přítomnosti chemického redukčního činidla – tzv. bezproudové či autokatalytické pokovování nebo elektrolytickou redukcí kationtů nanášeného kovu z elektrolytů na povrchu pokrývaného kovu – tzv. galvanické či elektrochemické pokovování. Tloušťka chemicky a elektrochemicky vytvořených povlaků je typicky v rozmezí jednotek až desítek mikrometrů.

1.1 Galvanické pokovování

Již naznačeným principem elektrochemického vylučování elementárního kovu je elektrolýza vodných roztoků kovových solí probíhající při průchodu stejnosměrného elektrického proudu. Na katodě, kterou v praxi tvoří pokovované materiály, dochází k redukcí kationtů příslušného kovu a jejich ukotvení na kovovém povrchu – tzv. elektrokystalizaci. Anoda se během procesu rozpouští a doplňuje tak úbytek kationtů kovu v roztoku. U procesů, kde nelze anodicky oxidovat vlastní kov, se používají anody inertní (olověné a ocelové) a úbytek kationtů v lázni se doplňuje dávkováním příslušných solí. Proces galvanického vylučování ovšem tak triviální není, kromě požadovaného se na katodě vylučují i jiné, tzv. balastní kovy (především Fe a Pb pocházející ze zbylých nečistot) a vodík.

Je-li pokovovaný materiál elektrochemicky ušlechtilější než kov vylučovaný, lze používat lázně složené z jednoduchých solí. V opačném případě dochází k tzv. cementaci – základní materiál se v roztoku rozpouští a na jeho povrchu se tvoří křehká, houbovitá vrstva ušlechtilějšího kovu, která se následně odlupuje. Ušlechtilější kovy je proto třeba vázat do relativně stabilních komplexů, které brání cementaci a rozkládají se až působením elektrického proudu. Galvanickým pokovením se v průmyslovém měřítku dělají povlaky ze Zn, Ni, Cu a Cr anebo slitinové, nejhojněji mosazné.

Kvalita galvanizace závisí kromě podmínek pracovních (tj. teplota, intenzita míchání a elektrický proud) a technologických (vylučovací rychlost a proudový výtěžek), především na pH a chemickém složení galvanické lázně, které jsou ovšem

velmi různorodé podle toho, z jakého kovu má být povlak vytvořen. Stabilní optimální hodnota pH, při kterém je kovová sůl dokonale rozpuštěna a při kterém se docílí požadovaných vlastností povlaku, je nutnou nikoli postačující podmínkou. Konkrétní oblast pH závisí na typu pokovování, pohybuje se od extrémně nízkého (lesklé mědění, $\text{pH} < 1$) po silně bazické (kyanidové pozinkování, $\text{pH} \sim 13$).

1.2 Chromovací lázně

Chrom je pro svou tvrdost, otěruvzdornost, trvalý lesk a barevnou variabilitu používán jako finální povlak povrchových úprav. Počátky technologie chromování spadají do poloviny devatenáctého století, kdy se roku 1856 podařilo německému chemikovi Antonu Geutherovi vyloučit jakési povlaky chromu z roztoku kyseliny chromové, resp. vodného roztoku oxidu chromového⁶. Komerčního využití se však tato technologie dočkala až o šedesát let později. Finkův patent, který je de facto považován za začátek průmyslového využití elektrochemického chromování, byl přihlášen v roce 1920.

Původní výchozí surovinou pro naprostou většinu chromovacích lázní byl již zmíněný oxid chromový, který je ve vodě velmi dobře rozpustný, chromanové ionty přitom částečně přecházejí na polychromany⁷. Elektrochemická redukce kovového chromu z čistě vodného roztoku je ovšem značně neefektivní, proto se do chromovacích lázní přidává kyselina sírová. Zjistilo se totiž, že roztoky obsahující oxid chromový znečištěný sírany mají paradoxně vyšší účinnost vylučování elementárního chromu. Síranové anionty se tak osvědčily jako nejvhodnější primární katalyzátory. Jako sekundární katalyzátory se nejhojněji používají alkylsulfonové kyseliny a jejich deriváty⁸. Lázně na bázi vodného roztoku oxidu chromového s kyselinou sírovou mají extrémně nízké pH, prakticky rovné nule.

1.3 Vývoj lázní na bázi redukce chromitých iontů

Přes všechna pozitiva související s vytvářením povlaků chromu redukcí jeho šestimocného oxidu má tato technologie jednu velkou nevýhodu, sloučeniny obsahující chrom ve formě Cr^{VI} jsou pro člověka vysoce toxické, karcinogenní a mutagenní^{9,10} a škodlivé pro životní prostředí. Americká organizace EPA zařadila šestimocný chrom na seznam nejrizikovějších a nejtoxičtějších látek¹¹. Evropská unie ve svých nařízeních

WEEE Directive¹² (Waste Electrical and Electronic Equipment, 2002/96/EC) a RoHS¹³ (Restriction of Hazardous Substances, 2002/95/EC) prosazuje recyklaci a opakované užívání všech typů elektrických výrobků a omezuje používání pokovovacích lázní na bázi redukce Cr^{VI} při výrobě automobilů, elektrických a elektrotechnických výrobků již od roku 2003. V následujících letech má být tento způsob výroby značně finančně sankcionován a nakonec úplně zakázán. V reakci na tato opatření se komerční firmy snaží vyvinout ekologicky přátelštější technologie chromování a nahradit potenciálně nebezpečné látky.

Jednou z nejslibnějších alternativ by mohlo být nahrazení šestimocného chromu trojmocným chromem, tedy přímo chromitými ionty^{14,15}, které jsou prakticky netoxické¹⁶. V minulosti se již vyskytly pokusy o zavedení chromovacích lázní na bázi redukce Cr^{III} (nejčastěji ve formě hydrátů síranu, chloridu či dusičnanu chromitého) do průmyslové praxe¹⁷, ale pro tehdejší náročnější technologie provozu, horší kvalitu vylučovaných povlaků a vyšší finanční náklady ve srovnání s lázněmi šestimocného chromu byly zamítnuty.

Nesrovnatelnou výhodou tohoto typu lázní je vysoká úroveň bezpečnosti provozu, nízká zdravotní rizika či potenciální dopad na životní prostředí. Dalšími klady už moderních lázní je řádově nižší účinná koncentrace sloučenin chromu v lázni (při rovnocenné kvalitě povlaku, poměr $130\text{g.l}^{-1} \text{Cr}^{\text{VI}}$ ku $5\text{g.l}^{-1} \text{Cr}^{\text{III}}$), vyšší proudová účinnost a lepší distribuce kovového povlaku na podkladovém materiálu. Při uvážení všech výše zmíněných fakt, se dnešní chromovací lázně zdají být ekologicky i ekonomicky výhodnou náhradou lázní šestimocného chromu.

Podle nejnovějších výzkumů by mohly být zdraví škodlivé sekundární katalyzátory ekvivalentně nahrazeny běžnými a v přírodě hojně zastoupenými karboxylovými kyselinami. Pokud jsou tyto látky přítomny v galvanické lázni, mohou plnit celou řadu funkcí¹⁸, například:

- při reakci se zásadami tvoří soli a tím udržují konstantní hodnotu pH lázni
- zvyšují hodnotu pH, při které dochází k precipitaci základních složek lázně a rozšiřují tak účinnou pokovovací oblast pH
- jako komplexotvorné látky zvyšují rychlost elektrodopozice vytvořením aktivního koordinačního iontu s Cr^{III}

- mají autokatalytické vlastnosti a stabilizují složení lázní

V současnosti patří mezi nejpoužívanější organické kyseliny (nebo jejich soli) s jednou karboxylovou skupinou kyselina mléčná, mravenčí a octová^{19,20}, z dikarboxylových kyselin pak jablečná, jantarová, malonová, šťavelová a vinná^{21,22}, a nakonec velmi významnou kyselinou se třemi karboxyly je kyselinou citronová²³ (častou příměsí chromovacích lázní je i anorganická kyselina boritá²⁴).

1.4 Pasivace konverzními povlaky

Při tvorbě konverzních povlaků, které jsou technologickou úpravou navazující na galvanické pokovení, reaguje chemická lázeň s povrchovou vrstvou kovu, přičemž dochází k její pasivaci - přeměně na nerozpustnou, chemicky inertní sloučeninu s dobrou adhezí k upravovanému materiálu. Účelem je zvýšení korozní odolnosti kovového povrchu anebo jeho obarvení, dále zvýšení přilnavosti organických nátěrů či plastů a usnadnění mazání pohyblivých součástí strojů namáhaných třením. Nejběžnějšími konverzními úpravami jsou anodická oxidace, chromátování a fosfátování.

Anodickou oxidací (též eloxace) v kyselém prostředí se na povrchu kovu vytváří jeho oxid, Al je nejznámější prvkem, u kterého se tato úprava provádí. Při chromátování se na povrchu kovu tvoří povlak chromanů základního kovu pocházejících z roztoků kyseliny chromové nebo reaktivních dichromanů. Pasivace fosfátováním se provádí při teplotě od 20 do 70 °C buď ponorem anebo postřikem především u nelegované oceli, hlavní složkou lázně je koncentrovaný roztok kyseliny fosforečné nebo fosforečnanů (odtud název), ze kterého se na rozhraní povrchu kovového substrátu a kapaliny vylučuje vrstva krystalických fosforečnanů.

Nově vyvíjené technologie pasivace kombinují výše uvedené techniky. Moderní pasivační lázně sestávají obdobně jako ty galvanické z demineralizované vody, soli trojmocného chromu, dusičnanů, fosforečnanů, chelatačního činidla, organických kyselin a povrchově aktivních látek. Jednotlivé komponenty jsou seřazeny podle jejich klesající koncentrace v lázni. Mezi běžně používané organické kyseliny patří kyselina mléčná, octová²⁵, šťavelová²⁶ a citronová^{27,28}. Jejich funkce je prakticky shodná jako v případě galvanizačních lázní.

2 Cíl práce

Hlavním cílem předkládané práce je vývoj vhodné předúpravy vzorku pro co nejvyšší účinnost vyvázání organických kyselin z jejich stabilních komplexů s chromitými ionty o vysoké koncentraci a následná analýza komerčně vyráběných průmyslových pokovovacích lázní technikou kapilární zónové elektroforézy, respektive stanovení vybraných kyselin obsažených v těchto roztocích.

Požadavky kladené na tuto metodu jsou maximální jednoduchost a rychlost předúpravy vzorku s použitím běžně dostupných chemikálií a laboratorního vybavení, co nejkratší doba CZE analýzy, snadný způsob vyhodnocení získaných dat a celkově nízké procesní náklady.

3 Teoretická část

3.1 Metody chemické analýzy lázní

Okamžité koncentrace hlavních i podpůrných složek lázně se v průběhu galvanizace a pasivace neustále mění, zcela zásadně tak ovlivňují efektivitu výrobního procesu a výslednou kvalitu vyloučených povlaků. Pravidelné monitorování obsahu těchto komponent je zcela klíčové pro kontinuální zajištění předepsaného složení lázní, vnitřní kontrolu správnosti technologického procesu a garanci kvality výrobku.

Již před více než sto lety se koncentrace ochranného kovu v lázních zjišťovala s použitím klasické vážkové analýzy, tato metoda však byla časově velice náročná. Spolu s rozvojem komplexních lázní obsahujících další aditiva a rostoucími požadavky na kontrolu i těchto látek byla nahrazena volumetrickým stanovením. Obsah rozpuštěných kovů se stanovoval komplexometricky²⁹ nebo jodometricky, ostatní složky byly analyzovány podle jejich chemické podstaty vhodnými redoxními a acidobazickými titracemi³⁰.

V současnosti jsou však i při rutinní analýze preferovány metody instrumentální, důvodem je výrazně kratší doba analýzy anebo možnost stanovit více složek zároveň. Pro stanovení nejen dominantního kovu, ale i kontaminantů a organických aditiv se využívají některé elektrochemické metody, například cyklická rozpouštěcí voltametrie (CSV – cyclic stripping voltammetry)³¹, pulzní cyklická rozpouštěcí voltametrie (CPSV - cyclic pulse stripping voltammetry)³² a pulzní cyklická galvanostatická analýza (PCGA – pulsed cyclic galvanostatic analysis)³³. Jejich nevýhodou při aplikaci v průmyslových roztocích je možnost nezávislého a dostatečně přesného stanovení pouze jedné organické látky v lázni s tím, že ostatní strukturně podobné organické složky musí být z důvodu těžko eliminovatelného interferenčního efektu maskovány. Toto je při uvážení komplexnosti matrice moderních lázní značně omezujícím faktorem. V praxi jsou tak elektroanalytické metody aplikovatelné jen na několik speciálních typů pokovovacích lázní.

Z hlediska jednoduchosti, rychlosti a přesnosti se u některých průmyslových roztoků ukázala jako nejvhodnější metoda analýzy pomocí UV-VIS spektrofotometrie³⁴. S použitím specifického chromogenního činidla^{35,36} lze stanovit i látky, které samy

vykazují nízkou absorpci anebo jsou natolik strukturně podobné jiné komponentě ve směsi, že by jejich vzájemné odlišení a stanovení jinak nebylo možné³⁷.

Použití plynové či kapalinové chromatografie je z důvodu krajních hodnot pH, chemické podstaty analyzovaných látek, složitosti matrice a době potřebné k separaci a předúpravě vzorků prakticky bezpředmětné. Populární separační metodou k analýze anorganických iontů i organických složek je iontová chromatografie³⁸ (IC), respektive aniontově-výměnná chromatografie (AEC - anion-exchange chromatography)^{39,40} a iontově vylučovací chromatografie (IEC - ion exclusion chromatography)⁴¹. Tyto poměrně jednoduché a spolehlivé techniky mají oproti výše zmíněným obrovskou výhodu, v principu totiž umožňují současnou identifikaci a stanovení více iontů s rozdílnou hodnotou a orientací náboje. Nicméně analýza reálných průmyslových roztoků těmito technikami je komplikovaná a problematická. Separace organických kyselin, které tvoří významnou součást lázní, pomocí AEC je náročná na čas a poskytuje velmi nízké rozlišení. Při použití IEC zase dochází k rozsáhlému poškození kolony, což je zapříčiněno vysokou koncentrací kovových iontů v pokovovacích roztocích. Tyto ionty se adsorbují na stacionární fázi tvořenou sulfonovaným polystyrenovým gelem.

V rámci elektromigračních metod byla testována technika izotachoforézy⁴² (ITP) a kapilární zónové elektroforézy^{43,44} (CZE – capillary zone electrophoresis). Ve srovnání s předešlými se CZE nabízí jako technika s minimální nutností předúpravy komplexního vzorku, nízkou spotřebou činidel - základního elektrolytu (BGE – background electrolyte) a výrazně kratší dobou analýzy. Mimoto poskytuje lepší rozlišení a díky vodnému prostředí umožňuje i měření absorbance při vlnové délce nižší než 200 nm. Celkově vzato je kapilární zónová elektroforéza vhodná pro potenciální stanovení kovových iontů, redukčních a komplexačních činidel v galvanických a pasivačních lázních. Publikovány už byly práce zabývající se analýzou roztoků obsahujících ionty Sn⁴⁵, Cr^{VI}^{46,47}, Co⁴⁸ a Zn⁴⁹. Analýza roztoku obsahujícího čistě Cr^{III} doposud publikována nebyla.

3.2 Kapilární zónová elektroforéza

Stanovení organických kyselin metodou kapilární zónové elektroforézy se běžně používá u vzorků s velmi různorodou matricí. Z potravin se analyzují například ovocné

džusy⁵⁰, pivo⁵¹, víno⁵², brandy⁵³, zelenina⁵⁴, mléčné produkty⁵⁵, z životního prostředí půdní extrakty⁵⁶, dešťová voda⁵⁷, v průmyslu to jsou technologické roztoky⁵⁸ a odpadní vody⁵⁹ a pro farmakologicko-medicínské účely tělní tekutiny, především moč⁶⁰.

Potřeba minimální předúpravy vzorku je již výše uvedenou výhodou CZE oproti ostatním metodám, alespoň podle publikované literatury. Touto předúpravou se míní prosté zředění analyzovaného vzorku destilovanou nebo lépe deionizovanou vodou a následná filtrace, kterou se předejde možnému zanesení kapiláry nerozpuštěnými částicemi. V případě vzorků obsahujících vysoký podíl rozpuštěných plynů jakými jsou třeba šumivé nápoje, pivo a víno se vše doporučuje odstranění plynné složky použitím ultrazvuku. Někteří autoři uvádí možnost přidavku ethylendiammintetraoctové kyseliny (EDTA)^{61,62} k uvolnění organických kyselin z jejich hypotetických komplexů s ionty kovů.

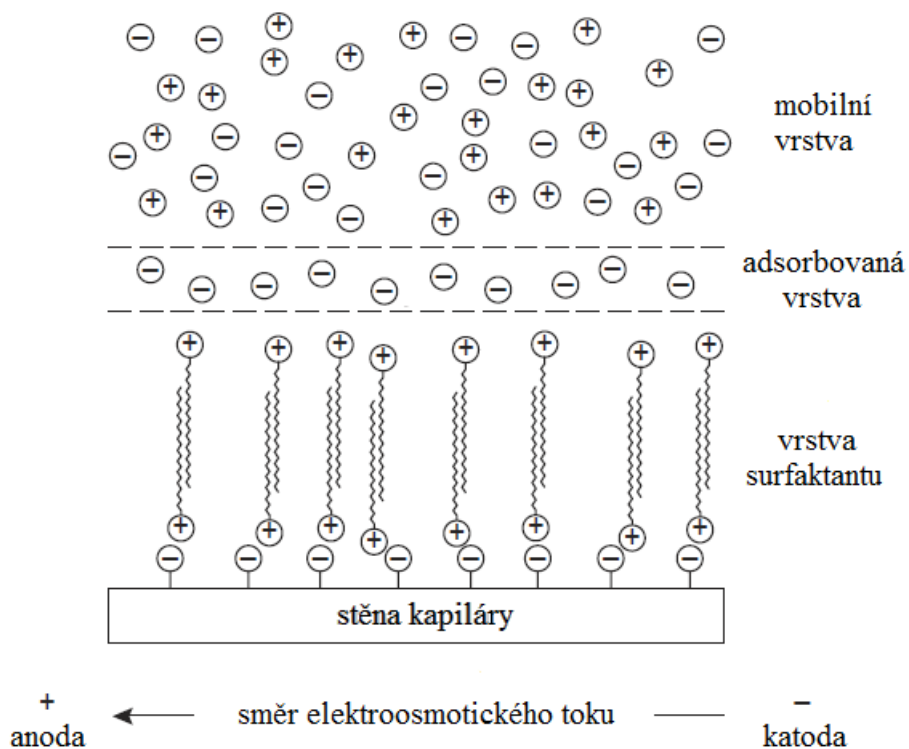
Mezi parametry, které ovlivňují účinnost elektroforetické separace a tudíž vyžadují optimalizaci při vývoji nové metody, patří zvolený separační mód, typ kapiláry, volba nosného elektrolytu a způsob dávkování.

3.2.1 Podmínky elektroforetické separace malých organických iontů

Malé organické kyseliny mají poměrně vysokou elektroforetickou mobilitu, která se za určitých podmínek může vyrovnat velikosti elektroosmotického toku (EOF – electroosmotic flow) nebo jej i převýšit, to zapříčiňuje prodloužení analýzy nebo dokonce znemožňuje její provedení. Jako vhodné opatření předcházející této situaci se používá mód tzv. reverzní polaritě napětí a potlačení či otočení směru EOF. Při obrácené polaritě napětí se vzorek dává na negativním (katodovém) konci kapiláry, zatímco detektor je umístěn blízko pozitivního (anodového) konce. Změny směru EOF se dosahuje buď použitím kapiláry s modifikovaným vnitřním povrchem anebo v případě nemodifikované křemenné kapiláry přidáním vhodného aditiva – kationtové povrchově aktivní látky do základního elektrolytu. K modifikaci povrchu se používají filmy polyakrylamidu, polytetrafluorethylenu a fluorovaného polyethylen-polypropylen kopolymeru nebo deaktivace stěn kapiláry silanizací či halogenací sulfonylchloridem a následnou reakcí s Grignardovými činidly.

Při vývoji nové metody je ovšem obvyklejší dynamické pokrytí vnitřní stěny kapiláry. Vhodným surfaktantem je zpravidla organický kation s delším alifatickým

řetězcem. Kladně nabité atomy tenzidu se elektrostaticky přitahují se záporně nabitými křemičitanovými skupinami na vnitřní stěně kapiláry. Nepolární řetězce jsou orientovány do středu kapiláry a díky hydrofobním interakcím se asociují s dalšími alifatickými řetězci, jejichž kladně nabitá skupiny směřují dovnitř kapiláry (viz. obr. 1).



Obr. 1 Schéma dynamického pokrytí povrchu kapiláry,
převzato z ⁶³ a upraveno

Takto vznikne další vrstva pozitivního náboje, která k sobě přitahuje anionty z BGE, z čehož plyne změna znaménka náboje na vnitřním povrchu kapiláry. Následná aplikace elektrického napětí způsobí, že veškerý roztok uvnitř kapiláry začne vlivem EOF migrovat směrem k anodě. Mezi typické surfaktanty patří kvartérní amoniové soli, například bromid a hydroxid cetyltrimethylamonium(1+) (CTAB⁶⁴, CTAH⁶⁵), bromid dodecyltriethylamonium(1+) (DTAB⁶⁶) anebo také bromid tetradecyltrimethylamonium(1+) (TTAB⁶⁷) a jeho obdoba ve formě hydroxidu (TTAH⁶⁸). V nedávné minulosti se objevily i práce zabývající se tenzidy na bázi mono- a dikationtových fosfoniových struktur⁶⁹. Obecně platí, že čím je látka hydrofóbnější, tím efektivněji otáčí směr EOF a výsledně zkracuje migrační časy organických kyselin.

Složení, koncentrace a pH základního elektrolytu jsou nejdůležitějšími parametry

pro optimální rozlišení a detekci v technice CZE. Jak je dobře známo, efektivní elektroforetická mobilita slabých elektrolytů se mění závisle na stupni jejich disociace, tedy na hodnotě pH. Převážná většina organických kyselin má hodnotu disociační konstanty pK_a v rozmezí 3-6. Podle teorie jsou organické kyseliny prakticky úplně disociované při pH o dvě jednotky vyšším nežli je jejich pK_a . Při splnění této podmínky by tedy mělo být pH nosného elektrolytu upraveno tak, aby bylo dosaženo maximální pufrací kapacity. Harrold a kol.⁷⁰ demonstroval možnost dalšího ovlivnění elektroforetické pohyblivosti karboxylových kyselin jakožto funkce teploty a iontové síly, přičemž velikost této změny se odvíjí od zvolené kyseliny. Jinou možností, jak ovlivnit separaci, je přidavek dvojmocných kationtů kovů, například vápníku, hořčíku⁷¹ nebo mědi⁷², do BGE, čímž dojde ke změně migračních časů organických kyselin díky utvoření koordinačních sloučenin různé stability. Malé množství organického rozpouštědla, kupříkladu methanolu nebo acetonitrilu⁷³, také může přispět k zlepšení rozlišení.

Volba způsobu dávkování závisí na matici vzorku. Množství nadávkovaného vzorku při elektrokinetickém dávkování závisí hlavně na vodivosti, EOF a na elektroforetických mobilitách stanovovaných látek. U hydrodynamického dávkování je objem vzorku prakticky nezávislý na složení matrice, ačkoli souvisí s její viskozitou. Při přímém srovnání těchto alternativ dosahuje hydrodynamické dávkování nižší citlivosti, ale poskytuje vyšší přesnost a je méně náchylné k chybě způsobené matričním efektem.

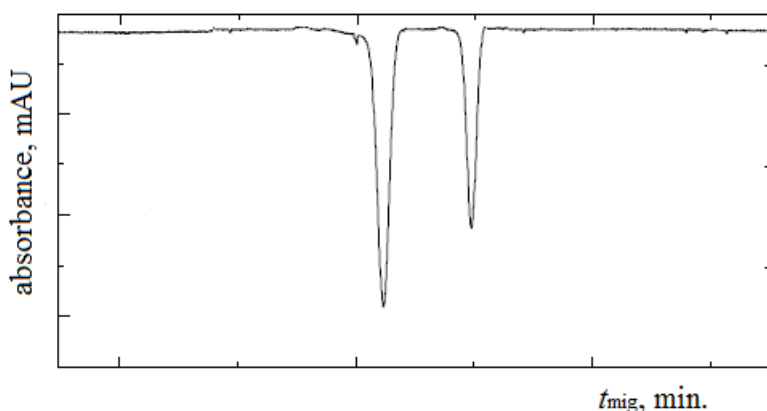
3.2.2 Možnosti detekce organických kyselin

Detekce musí být v technice CE prováděna přímo na separační kapiláře, protože eluční profil mimo homogenní elektrické pole se prudce mění z plošného na parabolický, dochází k vyšší disperzi a separační účinnost tak rapidně klesá. Při analýze malých organických aniontů je obvyklá přímá a nepřímá fotometrická absorpční detekce v UV oblasti, méně častá je pak detekce vodivostní, fluorescenční, elektrochemická a hmotnostní.

Pro použití přímé detekce je třeba zvolit vhodnou vlnovou délku, při které analyty absorbují záření mnohem více než BGE. Pro organické kyseliny je obecně ideální vlnová délka do 200 nm (například 185 nm^{71,74}). V případě přímé detekce je třeba použít neabsorbující elektrolyt, například TRIS ($pK_a = 8,07$; pH separačního elektrolytu

použitého při analýze – $\text{pH}_{\text{BGE}} = 3,4^{75}$), fosforečnanový ($\text{pK}_{\text{a},1} = 2,12$; $\text{pK}_{\text{a},2} = 7,34$; $\text{pK}_{\text{a},3} = 12,36$; $\text{pH}_{\text{BGE}} = 6,5^{76}$; $7,5^{77}$) a tetraboritanový ($\text{pK}_{\text{a}} = 9,22$; $\text{pH}_{\text{BGE}} = 9,3^{54}$) pufr. Značným omezením této techniky je její aplikovatelnost pouze pro dostatečně UV absorbující ionty.

Častější je metoda nepřímé UV detekce, vhodná pro analyzované látky, jejichž absorpce v ultrafialové oblasti spektra je nízká. V takovém případě obsahuje BGE i tzv. ko-ion, tedy ion intenzivně absorbující záření určité vlnové délky, který má stejné znaménko náboje jako analyty. Principem detekce je pokles absorbance při vytěsnění ko-iontů ze zóny neabsorbujícího analytu při zachování elektroneutality příslušné zóny. V elektroferogramu jsou pak zaznamenány negativní píky (viz. obr. 2).



Obr. 2 Ukázkový elektroforetický záznam dvou analytů při nepřímé detekci

U detektorů s diodovým polem (DAD, diode array detector) je možné detegovat více vlnových délek zároveň, což lze využít ke snadnější identifikaci látek anebo při nepřímé detekci s referenční vlnou délkou. Absorbance při jedné vlnové délce se po celou dobu analýzy prakticky nemění, zatímco u zvolených referenčních vlnových délek klesá, pomocí softwaru je pak možné získat elektroferogram s kladnými píky analytů odpovídajícími rozdílu absorbancí při zvolených vlnových délkách.

Nevýhodou této techniky je v porovnání s přímou detekcí větší šum, protože je registrována jakákoli látka, včetně nečistot, mající nižší absorbanci než ko-ion základního elektrolytu. Vlastní volba ko-iontu souvisí s jeho elektroforetickou mobilitou při daném pH, měla by být blízká mobilitě analytů. Samozřejmostí je koncentrace dostačující pro maximální rozsah měření poklesu absorbance. Chroman a molybdenan jsou typickými zástupci aniontových anorganických chromoforů. Výběr

organických absorbujících látek je rozmanitější, hojně používaný je ftalát, benzoát, dále kyselina 2,6-naftalendikarboxylová (NDC)⁷⁸, 2,6-pyridindikarboxylová (PDC)⁷⁹, pyromellitová (PMA) a trimellitová (TMA)⁵⁰. Nejčastější vlnové délky používané pro nepřímou UV detekci jsou 254 nm^{80,81,52,61} a 350 nm s referencí při 230 nm^{65,82,83}. Optimální pH BGE se při zvažování dostatečného rozdílu elektroforetických mobilit jednotlivých kyselin a pufrací kapacity zvoleného pufru pohybuje v rozmezí 5,5-6,5^{65,72,74,79,84}.

Další možností je elektroforetická analýza s vodivostní detekcí^{85,86}, zvláště její bezkontaktní varianta⁸⁷ (C⁴D) je hojně využívána zejména pro stanovení sacharidů a aminokyselin, které absorbují UV záření jen nepatrně. Pro použití fluorescenční detekce je nutná předchozí derivatizace karboxylových skupin, což je pro jejich malou reaktivitu ve vodném prostředí poměrně komplikované, využívá se tedy spíše v nevodných matricích. U elektrochemické detekce je problematické měření velmi malých proudů v detektoru při vysokém separačním napětí a potřeba aplikace velmi vysokého elektrického potenciálu k dosažení redoxní reakce karboxylů. Hmotnostní detekce poskytuje velmi komplexní informace o analyzovaném vzorku, je však finančně náročná na přístrojové vybavení a využívá se převážně při farmaceutické a biochemické analýze.

Vzhledem k rostoucímu počtu rutinních CZE analýz nejrůznějších matric jsou již několik let dostupné komerční základní elektrolyty vyrobené speciálně pro daný účel – například analýzu pokovovacích lázní, informace o jejich složení je bohužel mnohdy záměrně nedostupná.

V tab. 1 je uveden přehled publikovaných reálných pokovovacích roztoků, ve kterých bylo provedeno stanovení aniontů, s uvedenými podmínkami elektroforetického stanovení.

Tab. 1 Publikované pokovovací lázně – analýza aniontů

hlavní kov lázně	předúprava vzorku ^a	elektroforetické podmínky ^b	poznámka
Sn ⁴⁵	ředění (10×)	1,5 mM TEPA, 3 mM BTA, 15 mM TRIS v 20 % (v/v) CH ₃ OH; pH = 8,4; přímá UV detekce 254 nm; 65 cm × 50 μm	$t_{\text{anal.}} = 20 \text{ min.}$, opakovatelnost ($n = 5$) $t_{\text{mig.}} = 0,32 - 0,57 \%$, $A_{\text{peak}} = 3,0 - 4,7 \%$ (RSD)
	ředění (50×)	5 mM chroman, 0,5 mM TTAH; pH = 8,0; nepřímá UV detekce 270 nm; 65 cm × 50 μm	$t_{\text{anal.}} = 7 \text{ min.}$
Cr(VI) ⁴⁷	ředění	5 mM chroman, 0,2 mM HTAH, 10 mM DETA; nepřímá UV detekce 270 nm; 50 / 37,5 cm × 75 μm	$t_{\text{anal.}} = 5 \text{ min.}$
Ni ⁴⁹	ředění	25 mM fosforečnan, 0,5 mM OFMH; pH = 7; přímá UV detekce 185 nm; 60 cm × 75 μm	$t_{\text{anal.}} = 7 \text{ min.}$
Ni ⁶⁵	ředění (200×)	20 mM PDC, 5 mM CTAH; pH = 5,7; nepřímá UV detekce 350 nm (ref. 230 nm); 104 cm × 50 μm	$t_{\text{anal.}} = 15 \text{ min.}$, opakovatelnost ($n = 5$) $t_{\text{mig.}} = 0,03 \%$, $A_{\text{peak}} = 1,4 - 3,2 \%$ (RSD)
	ředění (500×)	20 mM PDC, 5 mM CTAH; pH = 5,7; nepřímá UV detekce 350 nm (ref. 230 nm); 72 cm × 50 μm	$t_{\text{anal.}} = 8 \text{ min.}$

^a Všechny roztoky byly na závěr předúpravy filtrovány, tento krok tedy není uveden v tabulce.

^b Ve všech případech byla použita křemenná kapilára.

Symbody a zkratky: $t_{\text{anal.}}$ – celková doba analýzy; BTA – 1,3,5-benzentrikarboxylová kyselina, DETA – diethylentriamin, HTAH – hydroxid hexadecyltrimethylamonia(1+), OFMH – nespecifikovaný modifikátor EOF ve formě hydroxidu, TEPA – tetraethylenpentaamin

4 Experimentální část

4.1 Popis vzorků

Za účelem stanovení koncentrace vybraných organických kyselin byly komerční firmou zabývající se povrchovou úpravou materiálů dodány dva vzorky průmyslových lázní. Pro snadnější identifikaci byly označeny jako PL1 a PL2. Na základě poskytnutých informací nebylo možné rozhodnout, zda se jedná o lázně galvanické či pasivační.

V popisu vzorku dodaném spolu s lázní PL1, která má modrofialovou barvu, bylo uvedeno pouze předpokládané složení, ovšem bez záruky. Směs má obsahovat kyselinu šťavelovou (OX), octovou (AC) a maleinovou (MAL), dále dusičnanové a chromité ionty, případné stopy Zn, Fe a Co v blíže nespecifikované formě. Přibližná koncentrace byla uvedena jen pro kyselinu šťavelovou, respektive to, že byl do lázně přidán dihydrát kyseliny šťavelové, jehož koncentrace v roztoku by odpovídala přibližně 50 g.l^{-1} . Později však byl dodán reálný vzorek, jehož deklarovaná hodnota odpovídala 30 g.l^{-1} dihydrátu kyseliny šťavelové, což odpovídá $21,43 \text{ g.l}^{-1}$ bezvodé OX v analyzované lázni.

Vzorek tmavě zelené lázně PL2 by měl obsahovat kyselinu citronovou (CIT) o předpokládané koncentraci $90\text{--}100 \text{ g.l}^{-1}$, fosforečnanové a chromité ionty a blíže nespecifikovaný polymer. Potenciálními nečistotami přítomnými v lázni mohou být fluoridové anionty a balastní částice Fe a Zn. I v tomto případě byl údaj o koncentraci později upřesněn, dodaný roztok tedy obsahuje CIT o koncentraci 89 g.l^{-1} .

Koncentrace chromitých iontů v obou vzorcích by se měla pohybovat v rozpětí $3\text{--}10 \text{ g.l}^{-1}$. Z dostupných informací lze předpokládat, že se budou výše zmíněné kyseliny nacházet v roztoku ve formě komplexních sloučenin různé stability.

4.2 Použité chemikálie

Chelaton III dihydrát (EDTA), fluorid sodný, kyselina citronová bezvodá (CIT), kyselina octová (AC, 99 %) a dihydrát kyseliny šťavelové ($\text{OX} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) byly pořízeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, ČR). Nonahydrát dusičnanu chromitého byl koupen od firmy POCH (Gliwice, Polsko), kyselina maleinová (MAL) od společnosti Lachema

(Brno, ČR) a hydroxid sodný od firmy Penta (Chrudim, ČR). Všechny chemikálie použité v této práci byly analytické kvality. K přípravě zásobních roztoků byla použita deionizovaná voda produkovaná Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

K analýze modelových i reálných roztoků byl použit komerční separační pufr Plating Bath Buffer for CE (pH = 5,7; Agilent P.N.: 5064-8236) vyráběný firmou Agilent Technologies (Waldbronn, Německo), který je určený přímo pro stanovení anorganických i organických komponent pokovovacích roztoků pomocí nepřímé UV detekce.

4.3 Předúprava vzorku

Příprava modelových směsí průmyslových roztoků byla provedena navážením odpovídajícího množství daných látek, poté jejich rozpuštěním či smísením s deionizovanou vodou a následným zředěním na požadovaný objem v odměrných baňkách. Připravené modelové roztoky byly poté po dobu jedné hodiny vařeny na vodní lázni.

V rámci předúpravy vzorku byl vždy pipetován 1,00 ml modelové směsi a k němu přidáno příslušné množství vyvazujícího činidla: 1,00 ml 0,6M NaF, 1,00 ml 0,6M EDTA nebo 0,25 ml 10M NaOH v případě směsi s OX, respektive 2,00 ml 10M NaOH pro směs s CIT. Objem roztoku vzorku byl poté upraven deionizovanou vodou na výsledných 10,00 ml. Doba varu na vodní lázni vařených roztoků byla 60 minut. Poté byl roztok zfiltrován přes 0,45 μ m PVDF filtr, dvacetkrát naředěn deionizovanou vodou a elektroforeticky analyzován.

4.4 Přístrojové vybavení

Měření a úprava pH modelových směsí a analyzovaných vzorků byla provedena na přístroji 3510 pH Meter od firmy Jenway (UK) se skleněnou elektrodou od téhož výrobce. V oblastech pH, kde by byla chyba měření příliš velká anebo kde by hrozilo poškození elektrody, byl pro odhad pH použit program PeakMaster 5.3⁸⁸.

Spektrofotometrická měření byla provedena s použitím 8453 UV-Visible spektrofotometru od firmy Agilent Technologies (USA) s použitím křemenné kyvety (optická délka 1 cm). Ke zpracování získaných dat byl použit software UV-Visible ChemStation od stejného výrobce.

K CZE separaci byla použita křemenná kapilára (vnitřní průměr 50 μm , vnější průměr 375 μm , CACO-Sila Tubing and Optical Fibers, Slovensko) o celkové a efektivní délce 50,0 cm, respektive 41,5 cm. Veškerá elektroforetická měření byla provedena na kapilární elektroforéze Agilent CE G1600AX s DAD detektorem, naměřená elektroforetická data byla zpracována a vyhodnocena s použitím softwaru Agilent 3D-CE ChemStation (USA).

4.5 Parametry CZE analýzy

Za účelem nepřímé UV detekce bylo v odpovídající oblasti vytvořeno detekční okno opálením polyimidové povlaku z povrchu kapiláru a zbylé nečistoty odstraněny s použitím ethanolu. Každá nová kapilára byla před použitím promyta deset minut 1M hydroxidem sodným a pět minut deionizovanou vodou. Dávkování vzorku bylo prováděno hydrodynamicky, tlakem 5 kPa po dobu pěti sekund. Napětí vložené na konce kapiláry bylo -25 kV, vzniklý elektrický proud měl velikost přibližně 40 μA . Teplota kazety s kapilárou byla termostatem udržována na hodnotě 25 $^{\circ}\text{C}$.

K registraci signálů jednotlivých zón analytů byla použita technika nepřímé UV detekce a absorpční spektrofotometrický detektor s diodovým polem, pracující při nastavené vlnové délce 350 nm (šířka pásma 20 nm) se zvolenou referenční vlnovou délkou 230 nm (šířka pásma 10 nm) a 254 nm (šířka pásma 10 nm). Před každým měřením byla kapilára promyta po dobu jedné minuty 1M hydroxidem sodným, jednu minutu deionizovanou vodou a jednu minutu separačním elektrolytem.

4.6 Identifikace a kvantifikace

K identifikaci a kvantifikaci stanovovaných látek byla použita metoda standardního přídatku. Důvodem bylo zachování stejného vlivu matrice, která je v reálných směsích poměrně komplikovaná a není zcela známa, na odezvu přístroje při měření modelových i reálných vzorků. Standardní přídatky byly vždy tři, přičemž první přídatek přibližně odpovídal předpokládané koncentraci analytu po výsledném zředění. Pro modelové směsi OX to bylo konkrétně 25, 50 a 75 μl kyseliny šťavelové o koncentraci 5,00 g.l^{-1} , respektive 50, 100 a 150 μl kyseliny citronové o koncentraci 5,00 g.l^{-1} pro modelové směsi CIT. Objem vzorku dávkovaného do vialky byl 25 μl , výsledný objem roztoku ve vialce byl upraven deionizovanou vodou na 500 μl . Každý vzorek byl dvakrát

analyzován. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byly z elektroferogramů s pomocí softwaru odečteny plochy píků. Naměřené výsledky, tedy účinnost vyvázání kyselin η z komplexů je vyjádřena v procentech původního množství kyselin rozpuštěných do modelové směsi. Směrodatná odchylka (SD) zjištěné účinnosti byla vypočtena podle vzorce pro výpočet SD v případě použití metody standardního přídatku⁶³:

$$s_x = \frac{s_r}{b_1} \left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2},$$

kde s_x odpovídá standardní odchylce naměřené hodnoty X , n počtu měření, b_1 směrnice přímky lineární regrese, \bar{y} aritmetickému průměru odečtených ploch píků, \bar{x} aritmetickému průměru objemů standardních přídatků, x_i objemu i -tého standardního přídatku a s_r standardní odchylce výpočtu lineární regrese definované rovnicí:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}},$$

zde je n rovno počtu provedených měření a výraz $(y_i - \hat{y}_i)$ vyjadřuje residuální chybu hodnoty y_i , tedy její vzdálenost na ose y od regresní přímky. Jelikož je vypočtená koncentrace analytu s použitím metody standardního přídatku stanovena extrapolčně, je její směrodatná odchylka obecně vyšší nežli SD z metody vnějšího standardu využívající interpolace.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Příprava modelových směsí

Na základě poskytnutých informací byly koncentrace chromitých iontů a kyseliny citronové a šťavelové v modelových směsích zvoleny tak, aby spadaly do koncentračních rozpětí původně uvedených komerční firmou. Koncentrace chromitých iontů v modelových směsích byla $5,00 \text{ g.l}^{-1}$ a jejich zdrojem byl v obou modelových lázních nonahydrát dusičnanu chromitého. Fosforečnan chromitý⁸⁹ obsažený v komerční lázni PL2 totiž není na trhu běžně dostupnou chemikálií. Jedná se o amorfni látku v pevném stavu tvořící hydráty proměnlivého složení v závislosti na podmínkách netriviální přípravy. Koncentrace dihydrátu kyseliny šťavelové v modelové směsi byla $50,00 \text{ g.l}^{-1}$ (to odpovídá $35,71 \text{ g.l}^{-1}$ bezvodé kyseliny) a koncentrace kyseliny citronové $96,00 \text{ g.l}^{-1}$.

Zásobní roztoky a z nich následně vytvořené modelové směsi průmyslových roztoků byly po navážení odpovídajícího množství daných látek připraveny rozpuštěním či smísením s deionizovanou vodou a zředěny na požadovaný objem v odměrných baňkách. Základní informace k analyzovaným kyselinám jsou uvedeny v tab. 2.

Připravené modelové směsi byly poté po dobu jedné hodiny vařeny na vodní lázni, aby se příprava modelových směsí co nejvíce podobala výrobě komerčních lázní v průmyslové praxi. Přehled a složení analyzovaných modelových a reálných roztoků je uveden v tab. 3.

Tab. 2 Základní charakteristika analyzovaných kyselin

kyselina	M_r [g.mol ⁻¹]	rozpustnost [g/100 ml H ₂ O]	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$
citronová	192,13	133 ^a	3,13	4,77	6,40
maleinová	116,07	78,8	1,92	6,23	—
octová	60,05	neomezeně mísitelná	4,76	—	—
šťavelová	90,03	9,0 ^a	1,27	4,27	—
(dihydrát)	126,07	13,8 ^a			

^a Uvedené hodnoty rozpustností a p-funkcí disociačních konstant odpovídají teplotě 25 °C, výjimkou je rozpustnost CIT a OX.2H₂O při 20 °C.

Tab. 3 Složení modelových a reálných směsí

označení směsi	$c_{\text{Cr}^{3+}}$ [g.l ⁻¹]	kyselina	c_{kys} [g.l ⁻¹]	pH
CR3OX50	3,75	OX ^a	50,00	1,62
CR5OX50	5,00		50,00	1,63
CR6OX50	6,25		50,00	1,64
CR5OX37	5,00		37,50	1,76
CR5OX62	5,00		62,50	1,55
CR3CIT96	3,75	CIT	96,00	2,24
CR5CIT96	5,00		96,00	2,24
CR6CIT96	6,25		96,00	2,48
CR5CIT72	5,00		72,00	2,31
CRCIT120	5,00		120,00	2,19
		OX	30,00	
PL1	—	AC	—	1,64
		MAL	—	
PL2	—	CIT	89,00	2,49

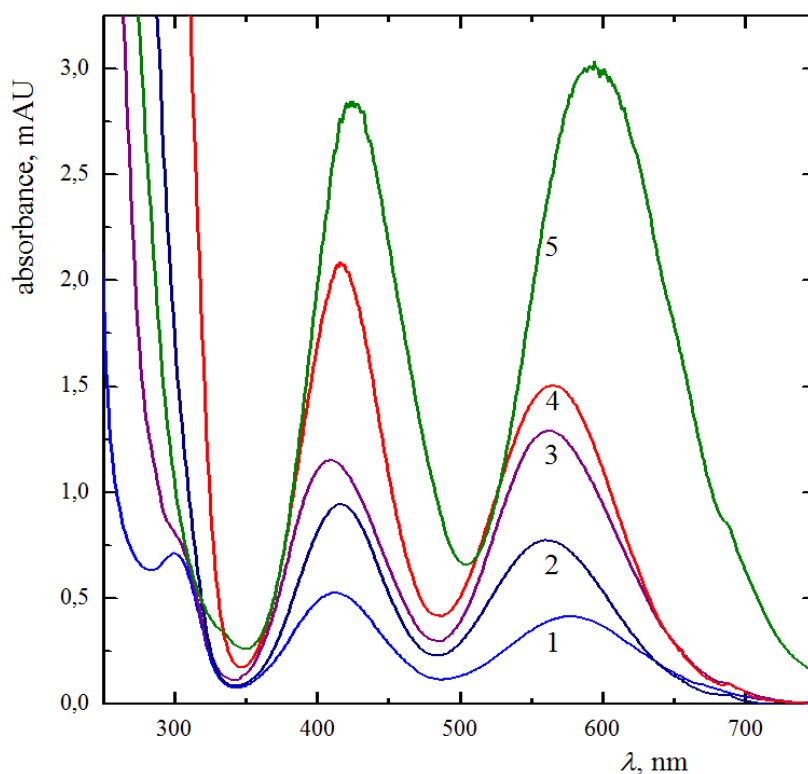
^a Směs byla připravena z dihydrátu kyseliny šťavelové, jehož koncentrace je uvedena v tabulce.

5.1.1 Spektra modelových směsí stanovovaných kyselin

Zreagování chromitých iontů s příslušnými kyselinami za vzniku komplexních částic bylo pro jednotlivé modelové roztoky ověřeno s použitím UV-VIS spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 190 – 1100 nm. V oblasti spektra mezi 250 a 750 nm byl patrný posun absorpčních maxim vzniklých komplexů kyselin oproti maximům vodného roztoku dusičnanu chromitého. Graf zobrazující absorpční spektra reálných směsí PL1 a PL2, připravených organických komplexů a dusičnanu chromitého je na obr. 3. Hodnoty vlnových délek lokálních absorpčních maxim jednotlivých komplexů jsou v tab. 4.

V oblasti kolem 300 nm má lokální maximum pouze komplexní hexaaquachromitý kation zatímco absorbance organických komplexů prudce vzrůstá. V případě druhého lokálního maxima ($\lambda \sim 415$ nm) dochází u připraveného komplexu kyseliny šťavelové

k posunu absorpčního maxima k vyšší vlnové délce oproti původnímu maximu $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, v komplexu s kyselinou citronovou pak k nižší vlnové délce, velikost tohoto posunu je do 4 nm. Třetí lokální maximum připravených komplexů obou organických kyselin se posunulo k nižším vlnové délce, u komplexu s CIT o 18 nm a komplexu s OX o 15 nm. Tato změna je rozlišitelná pouhým okem, vodný roztok chromitých iontů má zelenomodrou barvu, komplex kyseliny citronové má fialový a komplex kyseliny šťavelové červený odstín.



Obr. 3 Absorpční spektra studovaných komplexů

1 – Cr^{3+} ($5,00 \text{ g.l}^{-1}$), 2 – PL1, 3 – CR5CIT96, 4 – CR5OX50, 5 – PL2; všechny roztoky byly před měřením třikrát zředěny

Tab. 4 Lokální absorpční maxima komplexních sloučenin

směs /	$\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	CR5OX50	PL1	CR5CIT96	PL2
lokální maximum	λ_{max} [nm]				
1.	300	—	—	—	—
2.	413	416	415	409	423
3.	580	565	560	562	594

Vlnové délky absorpčních maxim modelového a dodaného roztoku kyseliny šťavelové jsou velmi podobné, rozdíl hodnoty λ_{\max} o 5 nm může být způsoben přítomností dalších složek směsi PL1. Odlišnost hodnoty vlnových délek modelové a reálné směsi obsahující CIT je velmi pravděpodobně ovlivněna tím, že zdrojem chromitých iontů v modelovém roztoku je dusičnan chromitý nikoli fosforečnan, jak je to mu v roztoku poskytnutém.

Absorbance modelových organických komplexů byla při stejné koncentraci chromitých iontů vyšší nežli absorbance vodného roztoku dusičnanu chromitého. Pravděpodobně se jedná o tzv. komplexy s přenosem náboje (charge-transfer). Fotony absorbované ligandy těchto komplexů usnadňují přechod elektronu z ligandu na kov, to se projevuje vysokou hodnotou molárního absorpčního koeficientu. U dodaných roztoků nebyla koncentrace chromitých iontů ve směsi známa. Podle naměřených dat lze konstatovat, že skutečně došlo k reakci chromitých iontů s organickými kyselinami za vzniku příslušných komplexů.

5.1.2 Aplikace komerčního pufru

Důvodem použití komerčně dostupného pufru určeného k elektroforetické analýze složek pokovovacích lázní bylo předchozí doporučení od poskytovatele reálných vzorků, který tento pufr běžně používá při rutinních měřeních. Pro firmy provádějící desítky rutinních analýz za den je především z časových důvodů výhodnější koupit si základní elektrolyt o garantovaných vlastnostech nežli si jej připravovat samostatně se striktním dodržením validovaného postupu přípravy. Mimoto použití vlastního základního elektrolytu (10 mM K_2CrO_4 ; 0,5 mM CTAB, pH = 8,0)⁹⁰ pro analýzu shodných reálných vzorků při předchozí studii provedené v naší laboratoři poskytlo výsledky s velmi špatnou opakovatelností.

5.2 Kyselina šťavelová - předúprava vzorku a stanovení

Na základě poznatků z prací publikovaných jinými autory^{65,71,83} byla modelová směs kyseliny šťavelové CR5OX50 před elektroforetickou analýzou pouze dvěstěkrát zředěna deionizovanou vodou (na teoretickou výslednou koncentraci 179 mg.l⁻¹ OX) bez jakékoli jiné úpravy a následně přefiltrována injekční stříkačkou přes filtrační nástavec s 0,45 μ m PVDF filtrem.

Koncentrace této kyseliny vypočtená s použitím metody standardního přídávku však neodpovídala skutečné hodnotě, tedy 50,00 g.l⁻¹ dihydrátu kyseliny šťavelové. Zjištěný obsah OX.2H₂O představoval pouze 0,88 % původního množství rozpuštěného do modelové lázně. Z tohoto lze předpokládat, že v modelové směsi vznikl stabilní komplex tvořený chromitým iontem jakožto centrální částicí a šťavelanovým aniontem jako jedním z ligandů s relativně vysokou hodnotou konstanty stability. Někteří autoři^{45,78} navrhuji pro dosažení lepšího rozlišení a ostřejších piků použít vyššího zředění roztoků s koncentrací analytů v rozmezí 25 – 100 mg.l⁻¹. Při šestisetnásobném zředění modelové směsi, kdy byla teoretická koncentrace OX v analyzovaném roztoku 60 mg.l⁻¹, bylo zjištěno 12,61 % deklarované koncentrace kyseliny šťavelové. Z takto nízké získané hodnoty vyplývá, že v případě této směsi bude pro dosažení vyšší účinnosti vyvázání kyseliny z komplexu předchozí úprava před vlastní CZE analýzou nezbytná.

Jednou z možností předúpravy vzorku je převedení centrální částice z komplexu s organickou kyselinou do komplexu s jinými ligandy a tím uvolnění ligandů původních. K tomuto účelu byly vybrány a testovány fluoridové, hydroxidové a ethylendiammintetraacetátové (EDTA) ionty. V tab. 5 jsou uvedeny dekadické logaritmy kumulativních konstant stability komplexů chromitých iontů s výše zmíněnými karboxylovými kyselinami a potenciálními komplexačními činidly v závislosti na stechiometrickém poměru centrálního iontu a příslušného ligandu.

Tab. 5 Kumulativní konstanty stability komplexů chromitých iontů s různými ligandy vyjádřené v logaritmickém tvaru

poměr	AC	CIT	MAL	OX	F ⁻	EDTA	OH ⁻
Cr ³⁺ /ligand	log β						
1:1	1,80	4,90	5,4	2,40	4,41	23	10,1
1:2	4,72	8,95	8,4	5,20	7,81	—	17,8
1:3	—	12,1	—	—	10,29	—	—
1:4	—	—	—	—	—	—	29,9

Na základě hodnot konstant stability lze předpokládat, že nejvhodnější bude vyvázání kyseliny s použitím aniontů EDTA či hydroxidovými ionty tvořícími

s chromitými ionty termodynamicky vysoce stabilní komplexy. Fluoridové a hydroxidové ionty mohou také reagovat s chromitými ionty za vzniku sraženiny CrF_3 ($\text{p}K_s = 10,18$), respektive $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ($\text{p}K_s = 30,2$). Jednotlivé potenciální ligandy byly do modelové lázně přidány ve stechiometrickém nadbytku ($\text{Cr}^{3+}/\text{ligandový anion} = 1/6$) a ponechány jednu hodinu reagovat jak za laboratorní teploty, tak za varu ve vodní lázni. Záměna ligandů byla ověřena změnou absorpčního spektra. Graf zobrazující absorpční spektra jednotlivých komplexů s původními a novými ligandy je na obr. 4. Hodnoty vlnových délek lokálních absorpčních maxim nových komplexů jsou v tab. 6.

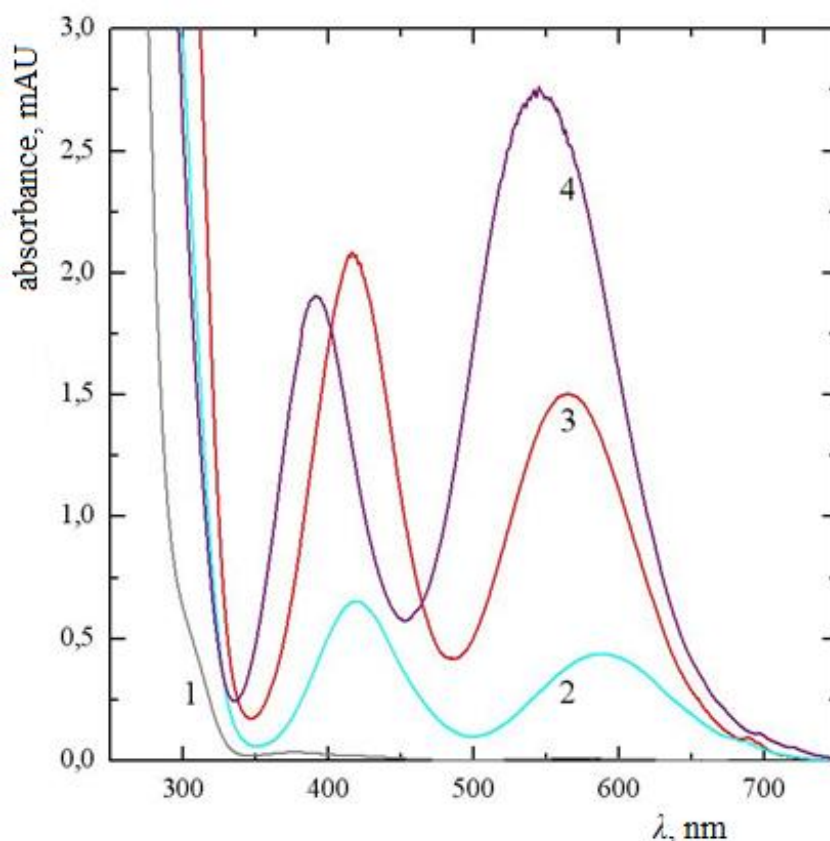
Tab. 6 Lokální absorpční maxima komplexů s novými ligandy

komplex /	původní OX	F^-	EDTA	OH^-
lokální maximum	λ_{max} [nm]			
1.	416	419	391	377
2.	565	588	545	—

První absorpční maximum se v případě fluoridových ligandů posunulo k vyšší vlnové délce jen minimálně (o 3 nm), s EDTA anionty již byl posun k nižší vlnové délce významnější (o 25 nm). U druhého absorpčního maxima došlo v komplexu s fluoridy k posunu o 23 nm k vyšší vlnové délce, zatímco u komplexu s EDTA ligandy to bylo o 20 nm k nižší vlnové délce.

Nový komplex s fluoridovými ligandy měl tyrkysově modrou barvu, komplex s EDTA ionty pak sytě fialovou. Po zreagování komplexu kyseliny šťavelové s přidanými hydroxidovými ionty se původně modrý roztok zcela odbarvil a na dně vialky se vytvořila řídká zelená sraženina podobající se gelu. S velkou pravděpodobností se jednalo o hydroxid chromitý. V naměřeném spektru tohoto roztoku vymizela původní absorpční maxima a objevilo se jiné, téměř nepatrné při 377 nm, což je mimo oblast viditelného záření.

Absorpční spektra komplexů se shodnými ligandy odlišná pouze reakční teplotou mají totožné vlnové délky absorpčních maxim. Absorbance povařených a nevařených EDTA–komplexů byla prakticky stejná. Vliv reakční teploty se projevil v případě F^- –komplexů, absorbance obou lokálních maxim nevařených komplexů byla přibližně o 0,15 AU vyšší než u komplexů vařených. Jelikož je koncentrace všech složek roztoku



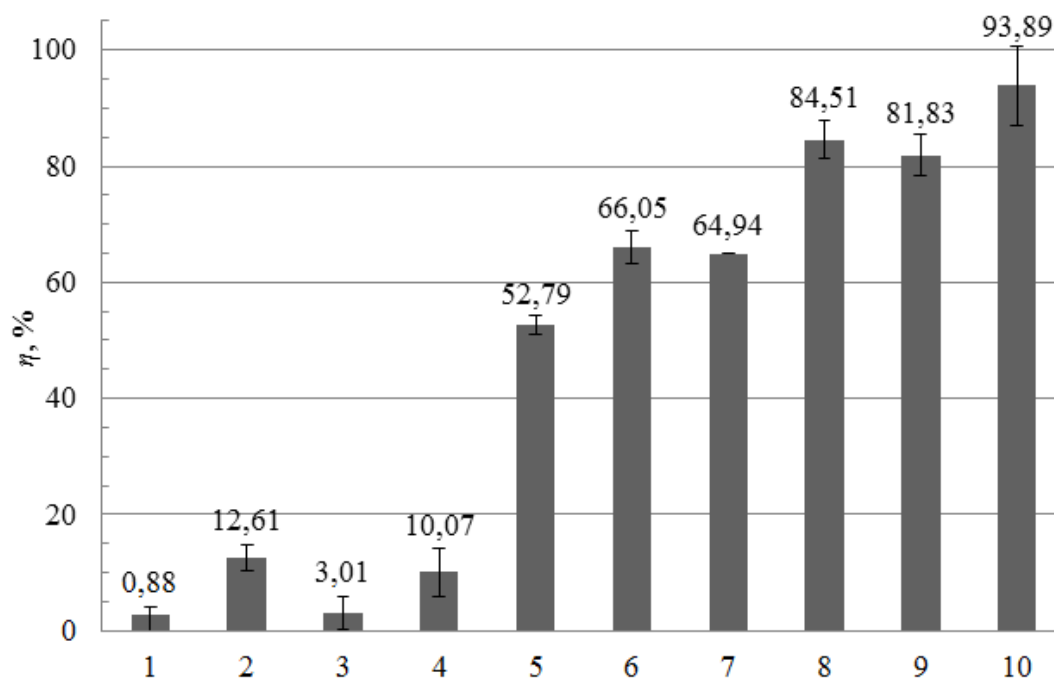
Obr. 4 Absorpční spektra původního komplexu OX s komplexačními ligandy
 1 – roztok obsahující hydroxidové anionty, 2 – komplex s fluoridovými anionty, 3 – původní komplex CR5OX50, 4 – komplex s anionty kyseliny ethylendiammintetraoctové; všechny roztoky byly před měřením třikrát zředěny; pro přehlednost jsou znázorněny jen komplexy, které byly po dobu jedné hodiny vařeny.

v obou vzorcích totožná, je tato odlišnost patrně způsobena rozdílným stupněm konverze, jehož hodnota je u nevařených komplexů nižší (což bylo následně potvrzeno rozdílnou vypočtenou účinností vyvázání OX). Dalším možným vysvětlením je různý molární absorpční koeficient, jehož hodnota je pro komplex s fluoridovými ligandy nižší než ta pro původní komplex kyseliny šťavelové. Absorbance obou roztoků s hydroxidovými ionty je ve viditelné oblasti spektra zanedbatelná. Podle naměřených spekter lze konstatovat, že po přidavku komplexačního činidla k původní směsi dojde k záměně ligandů vázaných na chromité ionty.

Elektroforeticky zjištěná účinnost vyvázání OX z původního komplexu s použitím jednotlivých způsobů předúpravy včetně použití komplexačních činidel je graficky

vyjádřena na obr. 5.

Vypočtené hodnoty účinnosti vyvázání kyseliny šťavelové z komplexu jsou ve shodě s původním předpokladem daným hodnotou konstanty stability (případně součinem rozpustnosti), jako nejvhodnější činidlo se prokázaly OH^- ionty. Důvodem nízké vypočtené hodnoty koncentrace volné OX po pouhém zředění bylo to, že většina kyseliny zůstávala vázána v komplexu s chromitými ionty. Dále lze usoudit, že var vzorků na vodní lázni příznivě ovlivňuje rychlost záměny ligandů, což se potvrdilo ve všech testovaných případech vyšší naměřenou koncentrací volné kyseliny.



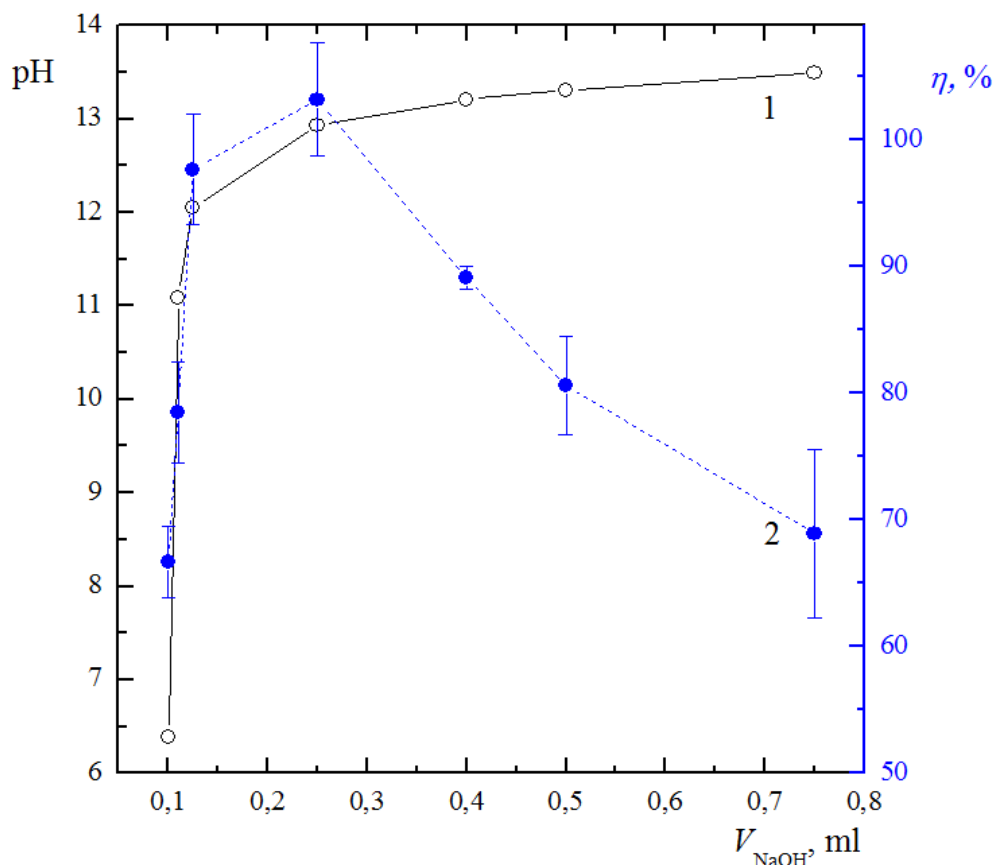
Obr. 5 Graf účinnosti vyvázání kyseliny šťavelové z modelové směsi CR5OX50 s použitím různé předúpravy vzorku

Pro porovnání jsou uvedeny i účinnosti vyvázání kyseliny z předešlých měření; 1 – 200x zředěno; 2 – 600x zředěno; 3 – F^- ; 4 – F^- var; 5 – EDTA; 6 – EDTA var; 7 – EDTA, $\text{pH} = 12,5$; 8 – EDTA, $\text{pH} = 12,5$, var; 9 – OH^- ; 10 – OH^- var (v obou případech odpovídal přírůstek 0,25 ml 10M NaOH). Jednotlivé hodnoty jsou opatřeny chybovými úsečkami, které odpovídají vypočteným směrodatným odchylkám.

U pokusů o vyvázání OX pomocí aniontů EDTA byl prokázán významný vliv pH vzorku. Kyselina ethylendiammintetraoctová ($\text{pK}_{\text{a},1} = 0$, $\text{pK}_{\text{a},2} = 1,50$, $\text{pK}_{\text{a},3} = 2,00$, $\text{pK}_{\text{a},4} = 2,68$, $\text{pK}_{\text{a},5} = 6,11$, $\text{pK}_{\text{a},6} = 10,17$) reaguje s kationty kovů pouze v jednotkovém poměru,

konstanta stability jejích komplexů řádově roste spolu s pH a maximální hodnoty dosahuje při pH ~ 12,3. Platí tedy nepřímá úměra, že čím vyšší je stabilita komplexu Cr^{3+} -EDTA, tím více je do roztoku uvolněno šťavelanových iontů.

Přídavek 10M hydroxidu sodného k 1 ml vzorku byl dále optimalizován. S rostoucí koncentrací OH^- iontů klesá na základě definice součinu rozpustnosti koncentrace Cr^{3+} iontů v roztoku. Při malém přídavku NaOH (pH ~ 6,4) nedošlo ke kompletnímu vysrážení chromitých kationtů ve formě hydroxidu a roztok nad sraženinou měl stále nazelenalou barvu. Hydroxid chromitý se z roztoku vylučuje v podobě světle zelené sraženiny, která má podobu od řídkého gelu po jemný prášek v závislosti na přídavku 10M hydroxidu sodného. Při extrémně vysokém přídavku hydroxidu (pH > 13) došlo vedle vysrážení zeleného $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ke vzniku bílé sraženiny šťavelanu sodného. Vliv přídavku NaOH na pH vzorku a následnou vypočtenou účinnost vyvázání OX je zobrazen v grafu na obr. 6.

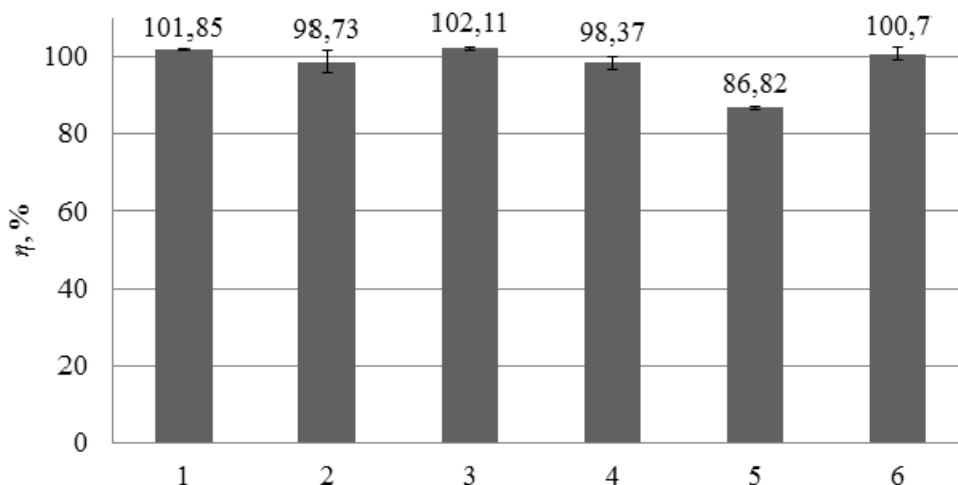


Obr. 6 Graf závislosti výsledného pH a účinnosti vyvázání OX ze směsi CR5OX50
 1 – křivka spojující body s vypočtenou hodnotou pH, 2 – křivka propojující body zjištěné účinnosti vyvázání kyseliny šťavelové z komplexu

Křivka závislosti pH na přidavku 10M NaOH má tvar sigmoidy, takže v silně bazické oblasti se i značný přídavek hydroxidu projeví jen malým vzrůstem pH. Z hlediska maximální efektivity vyvázání OX odpovídá nejvhodnější přídavek hydroxidu hodnotě 0,25 ml. U vyšších přidavků dochází k poklesu zjištěné koncentrace kyseliny šřavelové v modelovém roztoku, což je patrně způsobeno vysrážením šřavelanu sodného.

Pro modelovou směs CR5OX50 byl tedy nejvhodnějším činidlem vyvazujícím kyselinu 10M hydroxid sodný, jeho optimální přídavek ke směsi byl 0,25 ml. Dále byla testována robustnost celé metody pro rozdílný obsah komponent směsi. Jako dostatečně odlišná oproti původní modelové směsi byla zvolena směs s hodnotami koncentrací o 25 % nižšími, respektive vyššími buď pro chromité ionty anebo pro kyselinu šřavelovou. Takto velký rozdíl v obsahu složek komerční směsi je zcela nepřipustný, pokud by tedy tato metoda obstála u modelových směsí, lze ji považovat za dostatečně robustní pro skutečné komerční lázně.

Složení připravených modelových směsí pro testování robustnosti je uvedeno v tab. 3. Na obr. 7 je pak graficky vyjádřena účinnost vyvázání OX ze směsí o různém obsahu Cr^{3+} iontů a kyseliny šřavelové.



Obr. 7 Graf účinnosti vyvázání OX ze směsí o různém složení

1 – CR3OX50, 2 – CR5OX50, 3 – CR6OX50, 4 – CR5OX37, 5 – CR5OX62, přídavek 10M NaOH u těchto směsí odpovídal 0,25 ml; 6 – CR5OX62 s přídavkem 0,50 ml 10M NaOH v rámci předúpravy vzorku. Jednotlivé hodnoty jsou opatřeny chybovými úsečkami, které odpovídají vypočteným směrodatným odchylkám.

Hodnoty uvedené v grafu na obr. 7 jsou aritmetickým průměrem dvou výsledků vypočtených z opakovaného měření vzorků zahrnujícího i kompletní předúpravu. Na základě získaných výsledků pro testování robustnosti metody lze konstatovat, že je tato metoda dostatečně robustní i pro směsi, ve kterých se množství jednotlivých komponent liší o čtvrtinu oproti původní modelové směsi. Jedinou výjimkou byla směs CR5OX62, ve které byla zjištěna nižší účinnost vyvázání kyseliny šťavelové. Příčinou byl patrně nadbytek kyseliny oproti původní směsi a tím i nižší pH výsledného roztoku. S vyšším přídavkem, přesněji 0,50 ml, 10M hydroxidu sodného ke směsi bylo dosaženo vyhovující účinnosti vyvázání kyseliny. U reálných směsí s neznámou koncentrací OX je tedy nutná kontrola a případně úprava pH vzorku na hodnotu 12,9 až 13,1.

Po testování optimální předúpravy modelových vzorků průmyslové lázně byla provedena shodná předúprava a elektroforetická analýza reálné směsi PL1. Průměrná účinnost vyvázání kyseliny šťavelové ze dvou analýz byla 96,50 % (SD = 0,71 %).

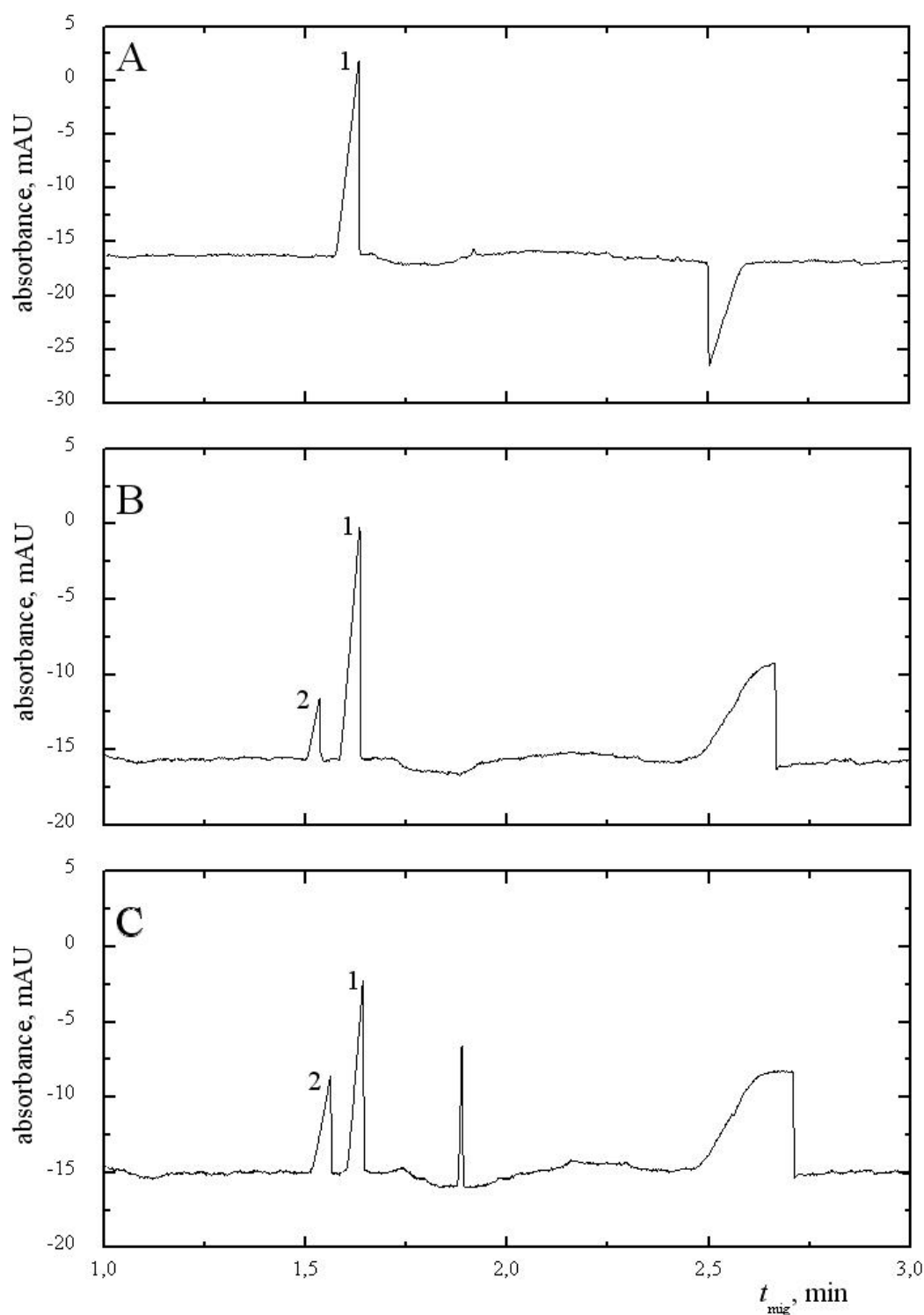
Opakovatelnost metody byla testována s komerční směsí PL1. Při testování opakovatelnosti samostatného elektroforetického měření byl celkem pětkrát změřen tentýž upravený vzorek reálné směsi PL1 bez standardního přídavku. Ze získaných dat, migračních časů a ploch píků OX, byl určen medián, vypočtena směrodatná odchylka a RSD v procentech jako podíl směrodatné odchylky a mediánu. Relativní směrodatná odchylka migračního času OX byla 0,34 % a RSD plochy píku 5,15 %. Na základě hodnoty RSD migračního času kyseliny šťavelové lze říci, že měření poskytuje přesné výsledky, směrodatná odchylka plochy píku je poněkud vyšší, nicméně se pohybuje v jednotkách procent, což je pro takto komplikovanou směs dostatečně přesný výsledek. Zjištěné relativní směrodatné odchylky migračního času a plochy píku jsou velmi podobné hodnotám pro OX uvedeným u analýzy průmyslové lázně obsahující cín⁴⁵, kde je $t_{\text{mig.}} = 0,52 \%$ a $A_{\text{peak}} = 3,8 \%$ ($n = 5$).

Současně byla zjištěna opakovatelnost celé metody včetně kompletní úpravy vzorku před vlastní analýzou. Medián účinnosti vyvázání pěti měření měl hodnotu 98,29 % a vypočtená směrodatná odchylka 6,99 %. Požadavkem komerční firmy, která průmyslové vzorky poskytla, na vyvíjenou metodu byla nejvyšší přípustná relativní směrodatná odchylka účinnosti vyvázání do 10 %, což tato metoda splňuje.

Pro zjištění, zda předúprava vzorku výrazně ovlivňuje přesnost elektroforetického měření, byl proveden jednostranný Fischerův test porovnávající rozptyly výsledků

pětkrát provedeného měření jednoho vzorku a pěti jednotlivých měření pěti vzorků. Vypočtená hodnota $F = 1,063$ byla nižší než kritická hodnota $F_{(4,4)} = 6,388$ (hladina významnosti $\alpha = 0,05$) a chyba měření způsobená vlastní předúpravou vzorku tedy není statisticky významná.

Na obr. 8 jsou pro porovnání zobrazeny elektroferogramy stejně zředěných vzorků čisté kyseliny šťavelové ve vodě (A), modelové směsi CR5OX50 (B) a reálné lázně PL1 (C), obě po optimalizované úpravě. Migrační časy dusičnanového a šťavelanového aniontu jsou ve všech třech rozdílných vzorcích prakticky totožné, zároveň je patrná celková podobnost elektroferogramů modelové a reálné směsi. Neidentifikovaný pík objevující se v elektroferogramech reálné směsi je neznámou komponentou dodané lázně.



Obr. 8 Elektroferogram vzorku kyseliny šřavelové

A – v řisté vodě ($50,00 \text{ g.l}^{-1}$); B – modelová směs CR5OX50, C – dodaná lázeň PL1; 1 – řřavelan, 2 – dusičnan; řšechny vzorky byly řředěny 200x řředěny; separační kapilára $50 \text{ }\mu\text{m} \times 50,0 \text{ cm} / 41,5 \text{ cm}$, komerční separační puřr pro analýzu pokovovacích lázní ($\text{pH} = 5,7$), nepřímá UV detekce při 350 nm (ref. 230 nm)

5.3 Kyselina citronová - předúprava vzorku a stanovení

Analogicky k předúpravě směsi obsahující OX byla modelová směs kyseliny citronové CR5CIT96 před elektroforetickou analýzou také dvěstěkrát zředěna deionizovanou vodou a přefiltrována přes 0,45 μm PVDF filtr, takže její teoretická koncentrace byla 480 mg.l^{-1} . Zjištěná koncentrace této kyseliny rovněž neodpovídala skutečné hodnotě, tedy 96,00 g.l^{-1} . V tomto případě to bylo 77,58 %, což je v porovnání s hodnotou OX (cca 1 %) sice podstatně vyšší hodnota avšak stále nízká.

Vysvětlení tohoto markantního rozdílu je dáno stupněm disociace jednotlivých kyselin, který souvisí s pH jejich lázní. Kyselina šťavelová má hodnotu $\text{p}K_{\text{a},1} = 1,27$ a pH lázně je 1,63, její disociace se tedy teoreticky pohybuje okolo 70 %. Zatímco kyselina citronová ($\text{p}K_{\text{a},1} = 3,13$) v lázni o $\text{pH} = 2,24$ je disociována přibližně z 10 %. Jelikož koordinační reakce probíhá mezi pozitivně nabitými částicemi chromu a ligandy nesoucími záporný náboj, lze předpokládat, že šťavelanové anionty se váží do komplexu. Nedisociovaná forma kyseliny citronové, které je v lázni přebytek, se na vzniku komplexu nepodílí. Po elektroforetické separaci je pak zjištěná koncentrace volné CIT vyšší než koncentrace OX.

Obdobně jako u kyseliny šťavelové bylo testováno větší zředění vzorku. Při tisícinásobném naředění modelové lázně a tedy teoretické koncentraci CIT v roztoku 96 mg.l^{-1} , bylo vypočteno 82,67% deklarovaného množství kyseliny citronové. I pro tuto směs bude pro dosažení vyšší účinnosti vyvázání potřeba před elektroforetickou analýzou roztok vhodně chemicky upravit.

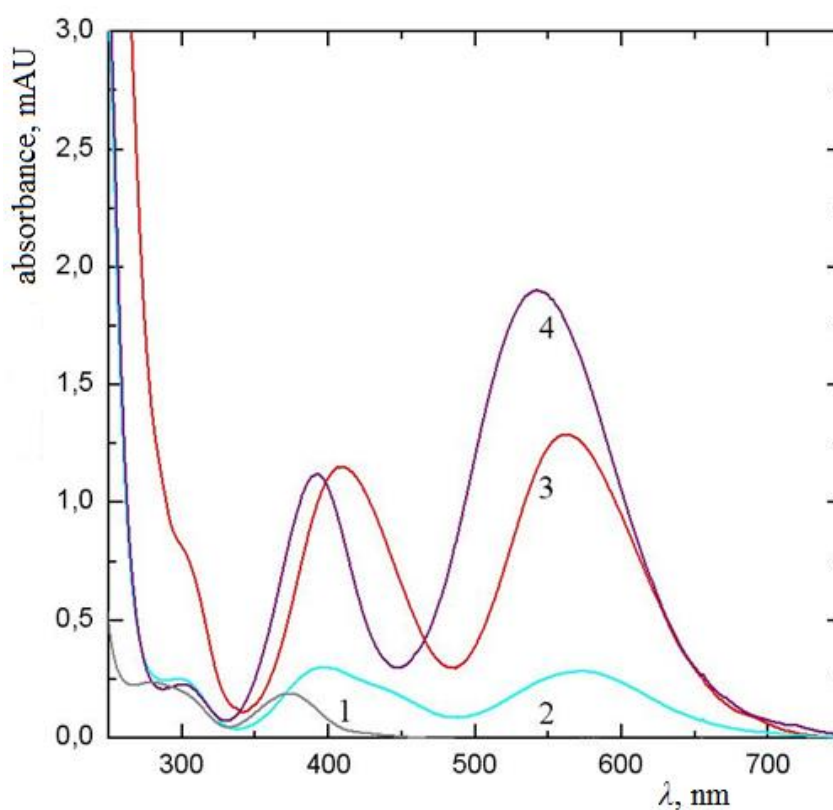
Za tímto účelem byly opět vyzkoušeny hydroxidové, fluoridové a EDTA anionty. Podle jejich konstant stability s Cr^{3+} ionty (viz. tab. 5) lze teoreticky předpokládat, že pozitivně ovlivní efektivitu vyvázání CIT z komplexu. Jednotlivá činidla byla ve stechiometrickém nadbytku ($\text{Cr}^{3+}/\text{ligandový anion} = 1/6$) přidána do modelové lázně a ponechána reagovat jak za varu na vodní lázni, tak za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny. Následně byla studována změna absorpčního spektra v důsledku záměny ligandů. Na obr. 9 je graf znázorňující spektra jednotlivých komplexů s původními a novými ligandy, hodnoty vlnových délek lokálních absorpčních maxim nových komplexů jsou uvedeny v tab. 7.

První lokální maximum komplexů s novými ligandy se pohybuje v UV oblasti okolo 300 nm, pro hydroxidové ionty je tato hodnota ještě nižší. Mimo křivky stejné

naředěného roztoku původního CIT–komplexu jsou v této oblasti patrná lokální maxima ostatních komplexů.

Tab. 7 Lokální absorpční maxima komplexů s novými ligandy

komplex/ lokální maximum	původní CIT	F ⁻	EDTA ⁴⁻	OH ⁻
	λ_{\max} [nm]			
1.	—	298	300	279
2.	409	396	392	373
3.	562	572	542	—



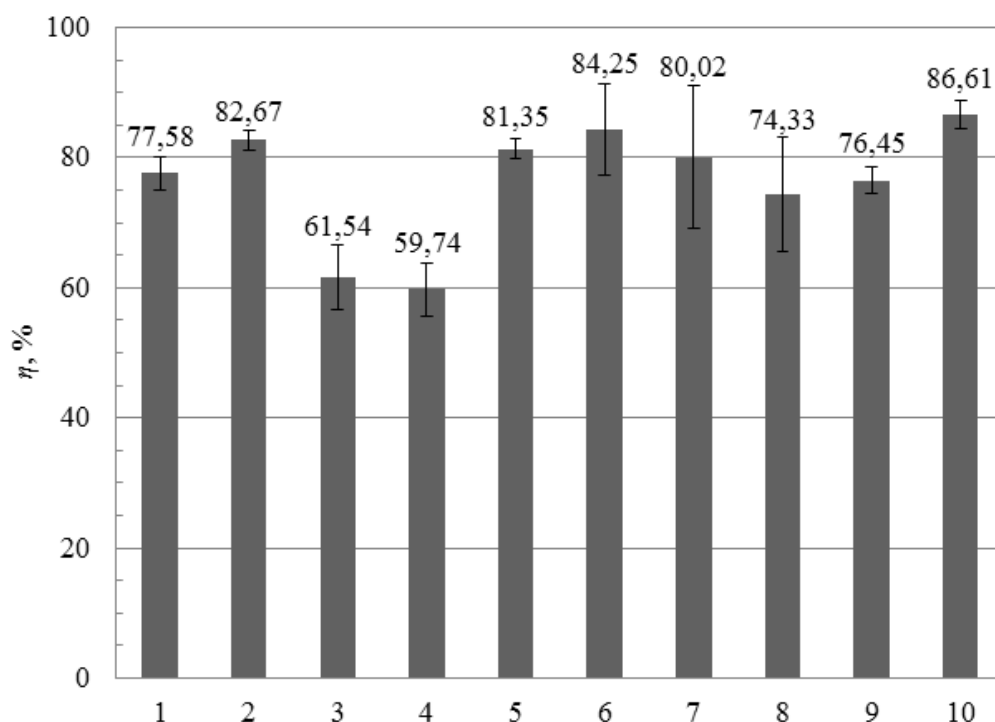
Obr. 9 Absorpční spektra původního komplexu CIT s komplexačními ligandy

1 – roztok obsahující hydroxidové anionty, 2 – komplex s fluoridovými anionty, 3 – původní komplex CR5OX96, 4 - komplex s anionty EDTA⁴⁻; všechny roztoky byly před měřením třikrát zředěny; pro přehlednost jsou znázorněny jen komplexy, které byly po dobu jedné hodiny vařeny.

Po desetinásobném zředění se i v komplexu kyseliny citronové objeví lokální absorpční maximum s vlnovou délkou 299 nm. K prokazatelnému posunu ve spektru tedy dochází jen u směsi obsahující OH^- ionty. Oproti komplexu s kyselinou se druhé lokální maximum komplexu s F^- posunulo k nižší vlnové délce o 13 nm, u EDTA iontů to bylo o 17 nm a v případě hydroxidu dokonce o 36 nm. Třetí absorpční maximum se v případě EDTA–komplexu posunulo o 20 nm k nižší vlnové délce, zatímco u F^- – komplexu to bylo o 10 nm k vyšší vlnové délce, pro směs obsahující OH^- ionty nebylo odpovídající maximum ve spektru nalezeno. Zabarvení roztoků s novými ligandy bylo stejné jako v případě OX, tj. komplex s fluoridy byl tyrkysově modrý a s EDTA sytě fialový. Roztok s OH^- ionty byl po proběhlé reakci bezbarvý se světle zelenou sraženinou hydroxidu chromitého na dně vialky.

Vlnová délka absorpčního maxima komplexů se stejnými ligandy ale různou reakční teplotou se nelišila. Absorbance nevařených a vařených fluoridových komplexů byla prakticky shodná. U komplexů s EDTA ionty se významně projevil vliv rozdílné reakční teploty na absorbanci druhého a třetího absorpčního maxima. Hodnota absorbance druhého lokálního maxima nevařeného komplexu byla o 0,6 AU nižší než absorbance vařeného komplexu, pro třetí maximum to pak bylo o 1,3 AU. Obdobně jako u kyseliny šťavelové je tento rozdíl pravděpodobně způsoben vyšším stupněm konverze vařeného EDTA–komplexu a vyšším molárním absorpčním koeficientem tohoto komplexu ve srovnání s původním CIT–komplexem. Absorbance směsi s hydroxidovými anionty je ve viditelné oblasti téměř nulová. Podle naměřených spekter lze říci, že po přidavku komplexačního činidla k původnímu roztoku dojde k záměně ligandů vázaných na chromité ionty.

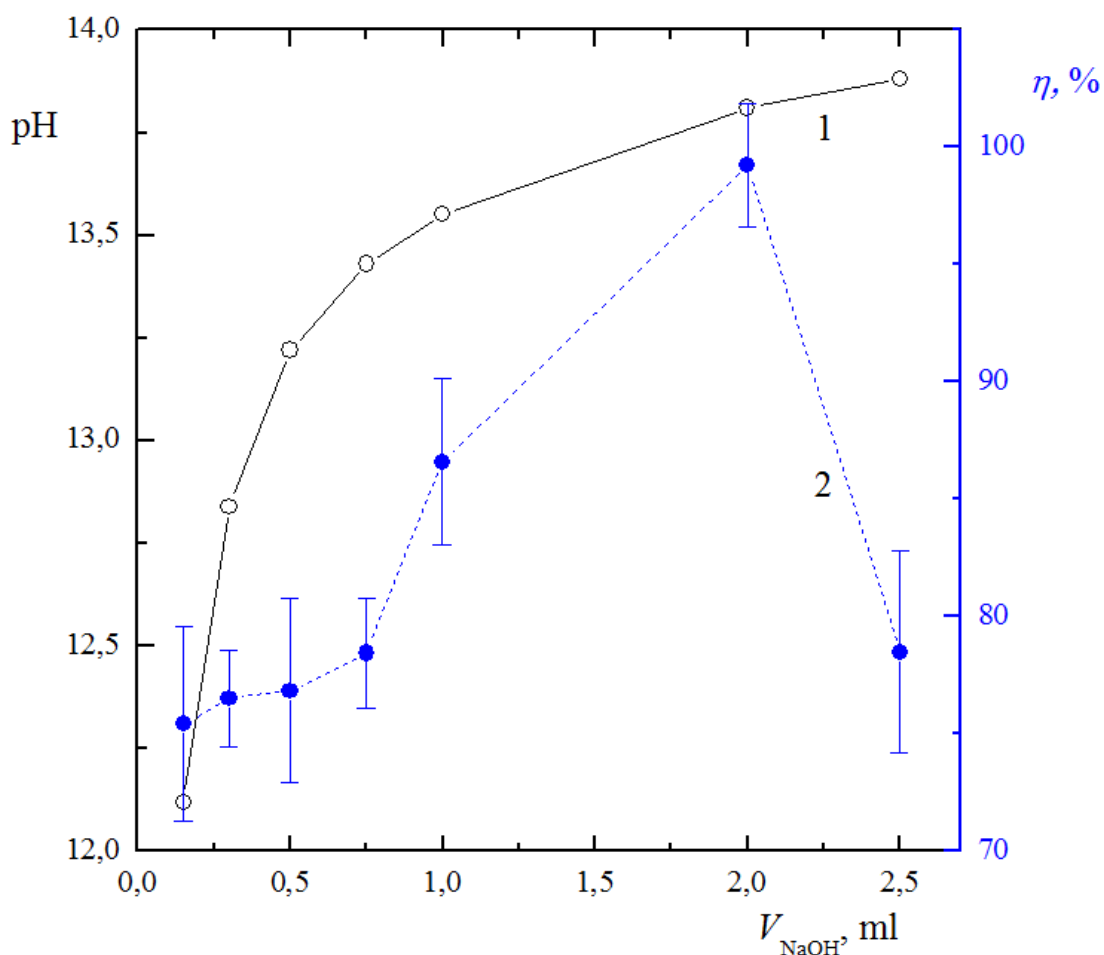
Na obr. 10 je graficky znázorněna elektroforeticky zjištěná účinnost vyvázání kyseliny citronové z původního komplexu různě zředěných roztoků a s pomocí komplexačních činidel. Hodnoty naměřené účinnosti vyvázání kyseliny citronové z komplexu pro vzorky upravené pouze zředěním jsou okomentovány výše. Účinnost vyvázání CIT s použitím fluoridových iontů se pohybovala pouze okolo 60 %. V případě vyvázání kyseliny citronové pomocí EDTA iontů při různém pH směsi jsou vypočtené hodnoty vzájemně srovnatelné. S použitím OH^- iontů za varu bylo dosaženo vysoké účinnosti vyvázání kyseliny, což je v souladu s nejvyšší konstantou stability OH^- –komplexu s chromitými ionty.



Obr. 10 Graf účinnosti vyvázání kyseliny šťavelové z modelové směsi CR5CIT96
Pro porovnání jsou uvedeny i účinnosti vyvázání kyseliny z předešlých měření; 1 – 200x zředěno; 2 – 1000x zředěno; 3 – F; 4 – F var; 5 – EDTA; 6 – EDTA var; 7 – EDTA, pH = 12,5; 8 – EDTA, pH = 12,5, var; 9 – OH; 10 – OH var (v obou případech odpovídal přidavek 1,00 ml 10M NaOH). Jednotlivé hodnoty jsou opatřeny chybovými úsečkami, které odpovídají vypočteným směrodatným odchylkám.

Pro potenciální dosažení lepších výsledků byl testován přidavek 10M NaOH, jeho vliv na pH vzorku a účinnost vyvázání kyseliny je graficky znázorněn na obr. 11. Hydroxid chromitý se z roztoku uvolňoval ve formě světle zeleného práškovité sraženiny. Při příliš vysokém pH se pod touto sraženinou tvořila další bílá sraženina, pravděpodobně šlo o citronan sodný. Křivka závislosti pH na přidavku 10M NaOH má sigmoidní tvar, tudíž se ani značný přidavek hydroxidu na vzrůstu pH v extrémně zásadité oblasti pH téměř neprojevil.

Z hlediska nejvyšší účinnosti vyvázání CIT z komplexu odpovídá nejvhodnější přidavek hydroxidu hodnotě 2,00 ml. Toto výrazné zlepšení efektivnosti rozhodlo o jeho aplikaci v rámci optimální předúpravy směsí obsahujících CIT. Vypočtená koncentrace kyseliny citronové v modelovém roztoku s vyšším přidavkem hydroxidu sodného klesá, což je zřejmě způsobeno vysrážením citrátu sodného.



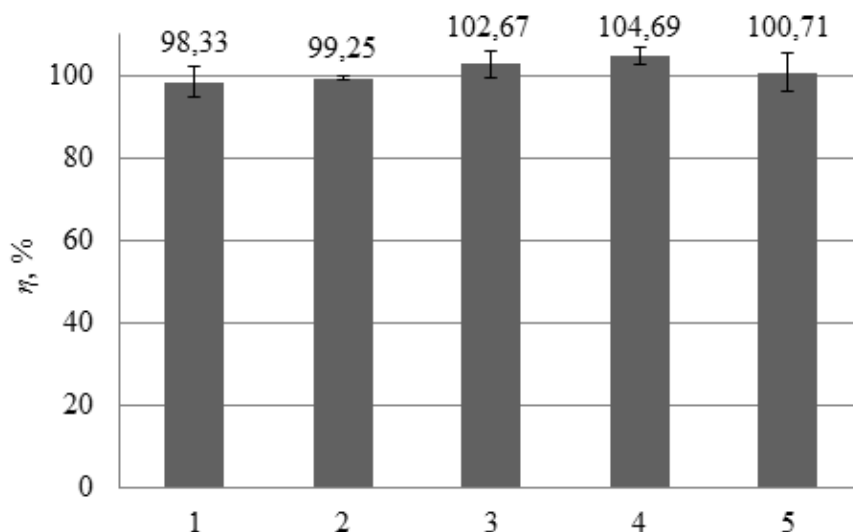
Obr. 11 Graf závislosti výsledného pH a účinnosti vyvázání CIT ze směsi CR5CIT96
 1 – křivka spojující body s vypočtenou hodnotou pH, 2 – křivka spojující body o spočtené hodnotě účinnosti vyvázání kyseliny šťavelové z komplexu

Pro modelovou směs CR5CIT96 byl jako nejvhodnější činidlo vyvazující kyselinu vybrán 10M hydroxid sodný, jehož optimální přídavek ke směsi byl 2,00 ml.

Dále bylo provedeno obdobné testování robustnosti metody vůči rozdílnému obsahu komponent lázně jako v případě kyseliny šťavelové. Hodnoty koncentrací chromitých iontů nebo kyseliny citronové se lišily o $\pm 25 \%$ ve srovnání s původní modelovou směsí. Složení připravených směsí obsahujících CIT pro testování robustnosti je uvedeno v tab. 3.

V grafu na obr. 12 je zobrazena účinnost vyvázání CIT ze směsí testovaných na robustnost metody, uvedené hodnoty jsou aritmetickým průměrem dvou výsledků vypočtených z opakovaného měření vzorků zahrnujícího i kompletní předúpravu

vzorku. Zjištěná hodnota účinnosti vyvázání kyseliny citronové se podle získaných dat pohybuje okolo 100 %, můžeme tedy říci, že je tato metoda robustní i pro modelové směsi, v nichž se koncentrace jednotlivých komponent různí o čtvrtinu od původní modelové směsi CR5CIT96.



Obr. 12 Graf účinnosti vyvázání CIT ze směsí o různém složení

1 – CR3CIT96, 2 – CR5CIT96, 3 – CR6CIT96, 4 – CR5CIT72, 5 – CR5CIT120, jednotlivé hodnoty jsou opatřeny chybovými úsečkami, které odpovídají vypočteným směrodatným odchylkám.

Po otestování optimální předúpravy modelových vzorků průmyslové lázně byla provedena identická předúprava a následná elektroforetická analýza reálné směsi PL2. Průměrná účinnost vyvázání kyseliny CIT ze dvou měření byla 97,53 % (SD = 0,79 %).

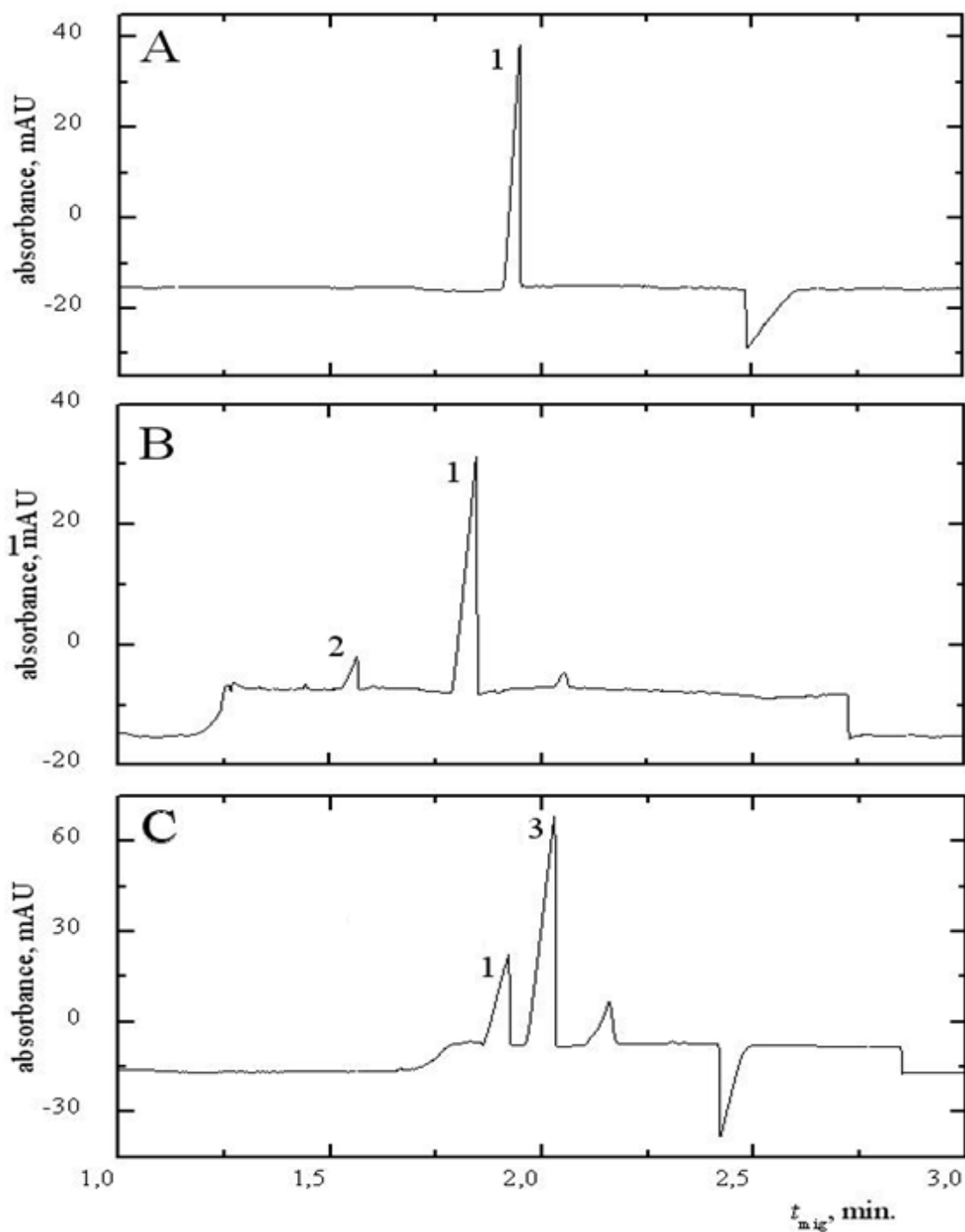
Měření opakovatelnosti metody bylo provedeno se směsí PL2. Pro zjištění opakovatelnosti samostatného elektroforetického měření byl celkem pětkrát změřen jeden upravený vzorek reálné směsi PL2 bez standardního přídatku. Ze získaných dat byl stejným způsobem jako u testování opakovatelnosti reálné směsi PL1 určen medián, vypočtena SD a RSD migračních časů a ploch píků kyseliny citronové. Relativní směrodatná odchylka migračního času CIT byla 0,51 % a RSD plochy píku 2,95 %. Hodnota RSD migračního času píku kyseliny citronové je o něco vyšší než v případě kyseliny šťavelové, u RSD plochy píku je tomu naopak. Daná měření tedy poskytují dostatečně přesné výsledky. Relativní směrodatné odchylky ($n = 5$) migračního času

(0,57 %) a plochy píku (4,5 %) uvedené pro CIT v analýze průmyslové lázně obsahující cín⁴⁵ jsou podobné RSD těchto veličin v této metodě.

Zároveň byla zjištěna opakovatelnost celé metody včetně kompletní úpravy vzorku. Medián účinnosti vyvázání pěti měření měl hodnotu 97,35 % a vypočtená směrodatná odchylka 2,78 %. Požadavek komerční firmy na maximálně 10 % relativní směrodatnou odchylku účinnosti vyvázání kyseliny metoda splňuje i s touto předúpravou vzorku.

Pro zjištění, zda předúprava vzorku výrazně ovlivňuje přesnost elektroforetického měření, byl proveden jednostranný Fischerův test porovnávající rozptyly výsledků pětkrát provedeného měření jednoho vzorku a pěti jednotlivých měření pěti vzorků. Vypočtená hodnota $F = 1,531$ byla nižší než kritická hodnota $F_{(4,4)} = 6,388$ ($\alpha = 0,05$), chyba měření způsobená vlastní předúpravou vzorku je tedy statisticky nevýznamná.

Elektroferogramy stejně zředěných vzorků čisté kyseliny citronové ve vodě (A), modelové směsi CR5OX96 (B) a reálné lázně PL2 (C) (obě po optimalizované úpravě) jsou pro srovnání podobnosti zobrazeny v obr. 13. Elektroferogramy modelové a dodané průmyslové lázně se vlivem matrice poněkud odlišují.

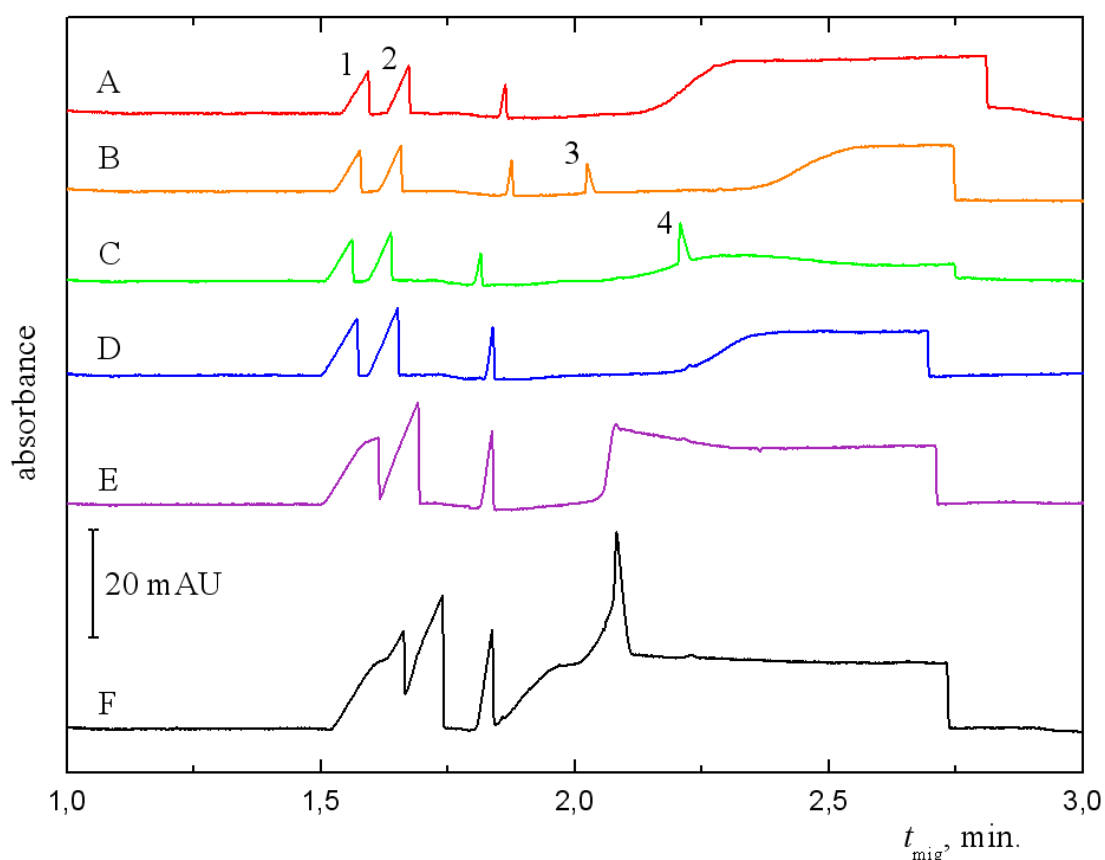


Obr. 13 Elektroferogram vzorku kyseliny citronové

A – v čisté vodě ($50,00 \text{ g.l}^{-1}$); B – modelová směs CR5CIT96, C – dodaná lázeň PL2; 1 – citrát, 2 – dusičnan, 3 – dihydrogenfosforečnan; všechny vzorky byly před analýzou 200x zředěny; separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 50,0 \text{ cm} / 41,5 \text{ cm}$, komerční separační pufř pro analýzu pokovovacích lázní ($\text{pH} = 5,7$), nepřímá UV detekce při 350 nm (ref. 230 nm)

5.4 Stanovení kyseliny maleinové a kyseliny octové

Dodaná průmyslová lázeň PL1 obsahuje kromě kyseliny šťavelové ještě kyselinu maleinovou a octovou, data o jejich koncentraci nebyly firmou poskytnuta. Při dvousténásobném zředění po provedení optimální předúpravy vzorku vyvinuté pro OX nebyly v elektroferogramu nalezeny žádné píky, které by těmito dvěma analytům mohly odpovídat. V obr. 14 je tato situace zdokumentována elektroferogramem (A). Do vzorku dodané upravené lázně bylo tedy přidáno 25 μl čisté MAL o koncentraci $1,00 \text{ g.l}^{-1}$, což odpovídalo zvýšení koncentrace kyseliny maleinové ve směsi o 50 mg.l^{-1} .



Obr. 14 Elektroferogramy lázně PL1 – různé naředění

A – 200x zředěno; B – 200x zředěno + přidavek čisté MAL zvyšující její koncentraci o 50 mg.l^{-1} , C – 200x zředěno + přidavek AC zvyšující její koncentraci o 30 mg.l^{-1} , D – 100x zředěno, E – 50 zředěno, F – 30x zředěno; 1 – dusičnan, 2 – šťavelan, 3 – maleinát 4 – octan; separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 50,0 \text{ cm} / 41,5 \text{ cm}$, komerční separační pufr pro analýzu pokovovacích lázní ($\text{pH} = 5,7$), nepřímá UV detekce při 350 nm (ref. 254 nm)

V elektroferogramu (B) se s detekcí při 350 nm a referencí při 230 nm žádný kladný pík neobjevil, s referencí při 254 nm však ano. Tento pík s $t_{\text{mig}} \sim 2,0$ min. byl posléze pomocí standardních přídavků identifikován jako maleinát. Situace ohledně rozdílnosti detekce kyseliny maleinové s použitím dvou různých referenčních vlnových délek je komentována níže. Na elektroferogramu (C) je zachycen pík s migračním časem okolo 2,2 min., který se na záznamu objevil po přidání 15 μl čisté AC o koncentraci $1,00 \text{ g.l}^{-1}$, tímto přídavkem byla zvýšena koncentrace kyseliny octové v analyzovaném roztoku o 30 mg.l^{-1} . Tento pík byl identifikován jako octanový anion metodou standardního přídavku. Na základě toho bylo testováno, zda se píky příslušných aniontů neobjeví v elektroferogramu při nižším zředění upraveného roztoku PL1. V elektroferogramech stokrát (D), padesátkrát (E) a třicetkrát (F) naředěného vzorku ovšem nebyly nalezeny žádné píky, jejichž migrační čas by se shodoval s těmi při standardním přídavku čisté MAL, respektive AC. Ani při ještě menším zředění roztoku nebylo možné příslušné píky identifikovat, stanovení těchto kyselin ve směsi PL1 upravené vhodným způsobem pro kvantifikaci OX tedy nebylo možné.

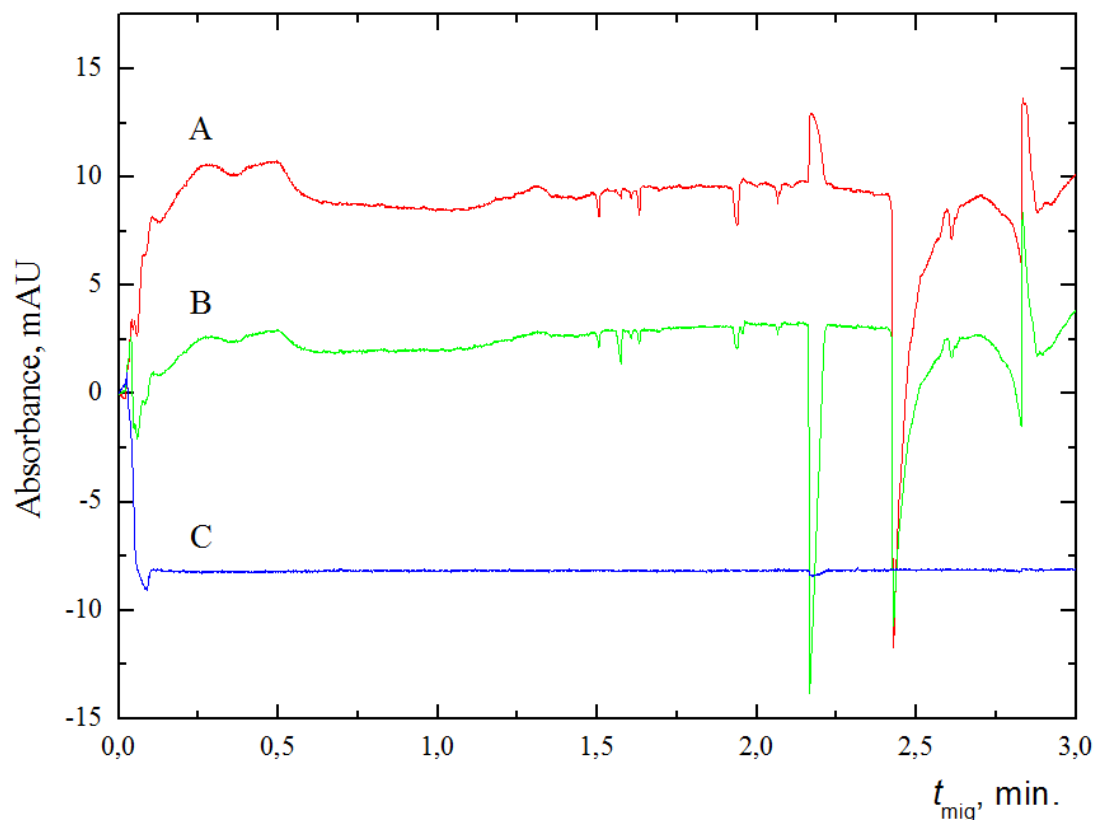
Odlišnost detekce signálu odpovídajícího MAL se dvěma různými referenčními vlnovými délkami je způsobena různou absorbancí, tato situace je graficky znázorněna na obr. 15. Na záznamu signálu s detekcí při 230 nm je v migračním čase okolo 2,2 minut patrný vzestup absorbance, zatímco pro detekci při 254 nm naopak její pokles. Při nepřímé detekci se tyto referenční vlnové délky projeví jako pokles (230 nm), respektive nárůst signálu (254 nm). Tento jev neovlivňuje koncentrace kyseliny maleinové ani matrice vzorku. Naměřená data pro MAL byla vyhodnocena z elektroferogramů s nepřímou detekcí při 350 nm a refencí při 254 nm.

Pro kyselinu šťavelovou, citronovou, maleinovou a octovou byla stanovena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Tyto údaje závisící na citlivosti metody byly vypočteny ze směrnice kalibrační přímky příslušného píku a výšky šumu základní linie, uvedené veličiny pro MAL a AC jsou v tab. 8.

Tab. 8 Hodnoty LOD a LOQ pro analyzované kyseliny

	OX	CIT	MAL	AC
LOD [mg.l^{-1}]	47	61	53	14
LOQ [mg.l^{-1}]	155	203	177	48

Podle vypočtené hodnoty limitu detekce by koncentrace kyseliny maleinové v neředěné lázni PL1 musela být minimálně $10,6 \text{ g.l}^{-1}$, aby ji bylo možné kvalitativně prokázat, respektive $35,4 \text{ g.l}^{-1}$ pro její kvantitativní stanovení. Nejnižší možná koncentrace kyseliny octové pro kvalitativní analýzu je $2,9 \text{ g.l}^{-1}$ a $9,6 \text{ g.l}^{-1}$ pro její kvantifikaci.



Obr. 15 Elektroferogram vzorku kyseliny maleinové

20x naředěná čistá kyselina maleinová o koncentraci $1,00 \text{ g.l}^{-1}$; A – detekce při 230 nm, B – detekce při 254 nm, C – detekce při 350 nm; separační kapilára $50 \mu\text{m} \times 50,0 \text{ cm} / 41,5 \text{ cm}$, komerční separační pufť pro analýzu pokovovacích lázní ($\text{pH} = 5,7$)

6 Závěr

V rámci vývoje metody předúpravy vzorku bylo testováno různé zředění vzorku a vyvázání kyselin z komplexu s použitím několika komplexačních činidel, tj. fluoridových, hydroxidových a EDTA iontů. Podle naměřených výsledků všech testovaných možností sestává optimální úprava vzorku kyseliny šťavelové i citronové před elektroforetickou analýzou z přidavku 10M hydroxidu sodného, 0,25 ml v případě směsi s kyselinou šťavelovou a 2,00 ml v případě směsi obsahující citronovou kyselinu, k 1,00 ml analyzované směsi, naředění roztoku na celkový objem 10 ml a následného varu po dobu jedné hodiny na vodní lázni, během kterého dojde ke kvantitativnímu vysrážení hydroxidu chromitého. Před elektroforetickou analýzou byl vzorek ještě dvacetkrát naředěn, takže výsledné zředění upraveného vzorku bylo dvouseťnásobné. Kvantifikace byla provedena metodou standardního přidavku.

Koncentrace citrátu a šťavelanu v reálném vzorku odpovídala 97,53 % (SD = 0,79 %), respektive 96,50 % (SD = 0,71 %) deklarovaného množství. Při testování opakovatelnosti metody ($n = 5$) byla RSD migračních časů pro kyselinu citronovou 0,51 % a pro šťavelovou 0,34 %, RSD plochy píků citrátového aniontu byla 2,95 %, šťavelanového iontu pak 5,15 %. Požadavek komerční firmy, která reálné průmyslové roztoky poskytla, aby RSD celé metody nepřesáhla 10 %, byl tedy splněn. Vyvinutá předúprava vzorku nemá statisticky významný vliv na rozptyl výsledků elektroforetické analýzy, což bylo potvrzeno Fischerovým testem. Stanovení obsahu kyseliny maleinové a octové nebylo z důvodu jejich nízkých koncentrací v reálném roztoku možné. Limit detekce kyseliny maleinové v matrici průmyslového PL1 byl vypočten na $10,63 \text{ g.l}^{-1}$ a limit kvantifikace na $35,43 \text{ g.l}^{-1}$, pro kyseliny octovou byl $\text{LOD} = 2,89 \text{ g.l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 9,62 \text{ g.l}^{-1}$. Celkový čas jedné analýzy byl kratší než 6 minut. Navržená metoda je jednoduchá, proveditelná s běžnými chemikáliemi, nenáročná na laboratorní vybavení a snadno vyhodnotitelná, lze ji tedy považovat za vhodnou pro rychlé rutinní stanovení kyseliny citronové a šťavelové v poskytnutých roztocích obsahujících chromité ionty.

Seznam literatury

- 1 Kreibich, V.; Hoch, K.: *Koroze a technologie povrchových úprav*, 2. vyd. Praha, České vysoké učení technické v Praze 1991.
- 2 Kraus, V.: *Povrchy a jejich úpravy*, Plzeň, Západočeská univerzita 2009. ISBN 978-80-7082-668-3.
- 3 Svoboda, M.: *Protikorozní ochrana kovů organickými povlaky*, Praha, SNTL 1985.
- 4 Ambrož, O.; Kašpar, J.: *Žárové nástřiky a jejich průmyslové využití*, Praha, SNTL 1990. ISBN 80-03-00347-4.
- 5 Vojtěch, D.: *Kovové materiály*, Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2006. ISBN 80-7080-600-1.
- 6 Dubpernell, G.: A history of chromium plating, *Plating & Surface Finishing* **71**, 84-91 (1984).
- 7 Svoboda, M.: *Protikorozní ochrana kovů galvanickými povlaky*, Praha, SNTL 1985. ISBN 04-603-85.
- 8 EP Pat 0860519. Frediani, L.; Merello, G.: *Chromium plating from baths catalyzed with alkanedisulfonic-alkanesulfonic compounds with inhibitors such as aminoalkanesulfonic acids and heterocyclic bases*. 26.8.1998.
- 9 EPA: *Chromium Compounds* [on-line] USA, 2000. Dostupné z URL: <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/chromium.html>> [cit. 2.10.2013]
- 10 EPA: *Toxicological review of hexavalent chromium* [on-line] USA, 1998. Dostupné z URL: <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0144tr.pdf>> [cit. 28.2.2014]
- 11 Graham, G.; Patry, M.; Shreve, P.: *Minimization of EPA 17 Hazardous Chemicals in Plating Shop at Tinker AFB* [on-line], Tinker AFB, Oklahoma, USA. Dostupné z URL: <<http://infohouse.p2ric.org/ref/23/22159.pdf>> [cit. 1.3.2014]

-
- 12 Směrnice WEEE 2002/96/EC [on-line] 2002. Dostupné z URL: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:037:0024:0038:en:PDF>> [cit. 25.10.2013]
- 13 směrnice RoHS 2002/95/EC [on-line] 2002. Dostupné z URL: <<http://www.rohs.cz/more.info.html>> [cit. 25.10.2013]
- 14 Bishop, C. V.; Wynn, P.C.: *Replacing Hexavalent Chromium* [on-line] 2002. Dostupné z URL: <<http://www.pfonline.com/articles/020102.html>> [cit. 20.9.2013]
- 15 EPA: *Trivalent Chromium Plating Process To Replace Hexavalent Chromium Plating* [on-line] USA, 2000. Dostupné z URL: <http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/1363/report/F> [cit. 2.10.2013]
- 16 EPA: *Toxicological review of trivalent chromium* [on-line] USA, 1998. Dostupné z URL: <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0028tr.pdf>> [cit. 28.2.2014]
- 17 Yoshida, T.; Yoshida, R.: Electrodeposition of chromium from trivalent sulfate baths. XXXIV. Mechanism of chromium electrodeposition, the electrodeposition of chromium alloys and a summary of the serial papers, *Nippon Kagaku Kaishi* **58**, 89-91 (1955). *CA* **49**:76988.
- 18 Guohua; L., H.; Huanwen, H.-Q.: Role of complexant in trivalent chromium plating baths, *Cailiao Baohu* **38**, 44-46 (2005). *CA* **147**:193738.
- 19 CN Pat 1880512 A. An, L.; Baosong, L.; Fuxing, G.: *Preparation of sulfate based chromium electroplating solution*. 20.12.2006.
- 20 CN Pat 101078131 A. Junyan, Z.; Zhixiang, Z.; Aimin, L.; Liping, W.; Litian, H.: *Method for electrodeposition of decorative chromium coating in Cr(III) plating solution*. 28.11.2007.
- 21 JP Pat 2009035806 A. Katayama, J.; Nagamine, S.: *Trivalent chromium plating bath and method of preparing the same*. 19.2.2009.

-
- 22 JP Pat 2011099126 A. Katayama, J.; Nagamine, S.: *Trivalent chromium plating bath, chromium plating method using it and chromium-plated product*. 19.5.2011.
- 23 CN Pat 102586815 A. Xianghua, J.: *Chromium plating brightening agent and preparation method thereof*. 18.7.2012.
- 24 Hoare, J. P.: The role of boric acid in dilute chromic acid plating baths, Annual Technical Conference Proceedings – *American Electroplater's Society* **70**, 9-13 (1983).
- 25 CN Pat 103215582 A. Chaohui, Z.; Jie, C.; Yun, X.; Weiyi, Y.: *Trivalent chromium passivating agent used for rapid film formation on steel plate surface*. 24.7.2013.
- 26 CN Pat 101469436 A. Junyan, Z.; Zhixiang, Z.; Aimin, L.: *Electrodeposition of chromium-based composite ceramic coating with environment-friendly trivalent chromium plating solution*. 1.7.2009.
- 27 CN Pat 103215580 A. Chaohui, Z.; Fusheng, W.; Yun, X.; Weiyi, Y.: *Trivalent chromium passivating agent with high corrosion resistance used for rapid film formation on steel plate surface*. 24.7.2013.
- 28 CN Pat 103215581 A. Yun, X.; Fusheng, W.; Weiyi, Y.; Chaohui, Z.: *Passivation enclosing integrated trivalent chromium passivating agent for fast processing steel plate surface*. 24.7.2013.
- 29 Persits, V.: Volumetric complexometric method to determine sulfate content in chromium plating solution, *Metal Finishing* **109**, 442-447 (2011).
- 30 Ruml, V.; Soukup, M.: *Galvanické pokovování*, Praha, SNTL 1981.
- 31 US Pat 20110266154 A1. Pavlov, M.; Shalyt, E.; Bratin, P.; Tsimberg, I.: *Analysis of an auxiliary leveler additive in an acid copper plating bath*. 3.11.2011.
- 32 Fisher, G. L.; Pellegrino, P. J.: The use of cyclic pulse voltammetric stripping for acid copper plating bath analysis, *Plating and Surface Finishing* **75**, 88-93 (1988).

-
- 33 US Pat 20040000484 A1. Sun, Z.; Yu, C.; Metzger, B; Nguyen, D. W.; Dixit, G.: *Methods in eletroanalytical techniques to analyze organic components in plating baths*. 1.1.2004.
- 34 Guo, C.-W.: Rapid analysis of Cr (III) in trivalent chromium-plating bath, *Diandu Yu Jingshi* **31**, 41-43 (2009). CA **152**:445026.
- 35 Qui, S.; Qui, X.; Qianmin, D.; Zhiyong, S.: Determination of copper sulfate in acid copper plating bath by spectrophotometry, *Diandu Yu Tushi* **21**, 34-36 (2002). CA **139**:300845.
- 36 Haimei, Z.; Zheimi, T.; Sifu, B.; Jinning, C.; Huasong, S.: Direct determination of hexavalent chromium in trivalent chromium plating bath, *Diandu Yu Huanbao* **29**, 42-44 (2009). CA **151**:278140.
- 37 Qui, S.; Qui, X.; Huang, S.: Rapid determination of high content ferric ion in acidic copper plating bath, *Cailiao Baohu* **37**, 53-55 (2004). CA **144**:403450.
- 38 Yamamoto, M; Yamamoto, H; Yamamoto, Y.: Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations by Ion Chromatography with Ethylenediaminetetraacetic Acid as Eluent, *Analytical Chemistry* **56**, 832-834 (1984).
- 39 Baziramakenga, R.; Simard, R. R.; Leroux, G. D.: Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography, *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 349-356 (1995).
- 40 Ammann, A. A.; Ruettimann, T. B.: Simultaneous determination of small organic and inorganic anions in environmental water samples by ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* **706**, 259-269 (1995).
- 41 Glód, B.: Ion Exclusion Chromatography: Parameters Influencing Retention, *Neurochemical Research* **22**, 1237-1248 (1997).
- 42 Kojima, K.; Yagi, T.: Analysis of electroless nickel plating bath by isotachopheresis, *Kinzoku Hyomen Gijutsu* **36**, 104-109 (1985). CA **102**:230978.

-
- 43 Jones, W. R.: Method development approaches for capillary ion electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **640**, 387-395 (1993).
- 44 Lee, Y.-H.; Lin T.-I.: Determination of metal cations by capillary electrophoresis Effect of background carrier and complexing agents, *Journal of Chromatography A* **675**, 227-236 (1994).
- 45 Sun, H.; Lau, K. M.; Fung, Y. S.: A new capillary electrophoresis buffer for determining organic and inorganic anions in electroplating bath with surfactant additives, *Journal of Chromatography A* **1217**, 3244-3250 (2010).
- 46 Dabek-Zlotorzynska, E.; Lai, E. P. C.; Timerbaev A.R.: Capillary electrophoresis: the state-of-the-art in metal speciation studies, *Analytica Chimica Acta* **359**, 1-26 (1998).
- 47 Kobayashi, Y.; Fujiwara, Y.: Quantitative analysis of SO_4^{2-} and SiF_6^{2-} in chromium plating solution by capillary electrophoresis, *Hyomen Gijutsu* **54**, 616-617 (2003).
CA **140**:34988.
- 48 Naujalis, E.; Cepyte, J.; Padarauskas, A.: Speciation of Co(II), Co(III) and Cu(II) in ethylenediamine solutions by capillary electrophoresis, *Analytical and bioanalytical chemistry* **376**, 759-762 (2003).
- 49 Oehrle, S. A.: Determination of inorganic and organic ions in nickel-plating baths by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **739**, 413-419 (1996).
- 50 Xiong, X.; Li, S. F. Y.: Selection and optimization of background electrolytes for simultaneous detection of small cations and organic acids by capillary electrophoresis with indirect photometry, *Journal of Chromatography A* **822**, 125-136 (1998).
- 51 Soga, T.; Wakaura, M.: Determination of inorganic and organic anions in beer and wort by capillary electrophoresis, *Journal of the American society of Brewing Chemists* **55**, 44-46 (1997).

-
- 52 Rovio, S.; Sirén, K.; Sirén, H.: Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids and carbohydrates in some Pinot Noir red wines, *Food Chemistry* **124**, 1194-1200 (2011).
- 53 García Moreno, M. V.; Jurado Campoy, C. J.; Garcia Barroso, C.: Method devised for determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples, *European Food Research and technology* **213**, 381-385 (2001).
- 54 Rosello, S.; Galiana-Balaguer, L.; Herrero-Martinez, J. M.; Maquieira, A.; Nuez, F.: Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 1101-1106 (2002).
- 55 Izco, J. M.; Tormo, M.; Jimenez-Flores, R.: Development of a CE Method to Analyze Organic Acids in Dairy Products: Application to Study the Metabolism of Heat-Shocked Spores, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1765-1773 (2002).
- 56 Ahumada, I.; Mendoza, J.; Escudero, P.; Mossert, K.; Ascar, L.: Determination of organic acids of low molecular weight and phosphate in soil by capillary electrophoresis, *Journal of AOAC International* **84**, 1057-1064 (2001).
- 57 Hagberg, J.; Dahlen, J.; Karlsson, S.; Allard, B.: Application of capillary zone electrophoresis for the analysis of low molecular weight organic acids in environmental samples, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **78**, 385-396 (2000).
- 58 Chen, J.; Preston, B. P.; Zimmerman, M. J.: Analysis of organic acids in industrial samples. Comparison of capillary electrophoresis and ion chromatography, *Journal of Chromatography A* **781**, 205-213 (1997).
- 59 Fiehn, O.; Wegener, G.; Jekel, M.: Capillary electrophoretic analysis of organic anions in tannery wastewater including high contents of chloride and sulfate, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **69**, 257-271 (1998).

-
- 60 Chen, H.; Xu, Y.; Van Lente, F.; Ip, M. P. C.: Indirect ultraviolet detection of biologically relevant organic acids by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B* **679**, 49-59 (1996).
- 61 Westergaard, B.; Hansen, H. C. B.: Determination of anions in soil solutions by capillary zone electrophoresis, *Analyst* **123**, 721-724 (1998).
- 62 Kubáň, P.; Kubáň, P.; Kubáň, V.: Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations after complexation with ethylenediaminetetraacetic acid, *Journal of Chromatography A* **836**, 75-80 (1999).
- 63 Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*, Boston, McGraw-Hill 2000. ISBN 0-07-237547-7.
- 64 Tsuda, T.: Tsuda, T.: Modification of electroosmotic flow with cetyltrimethylammonium bromide in capillary zone electrophoresis, *Journal of High Resolution Chromatography* **10**, 622-624 (1987).
- 65 Soga, T.; Ross, G. A.: Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **834**, 65-71 (1999).
- 66 Buchberger, W.; Haddad, P. R.: Effects of carrier electrolyte composition on separation selectivity in capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions, *Journal of Chromatography A* **608**, 59-64 (1992).
- 67 Horie, H.; Yamauchi, Y.; Kohata, K.: Analysis of organic anions in tea infusions using capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **817**, 139–144 (1998).
- 68 Romano, J.; Jandik, P.; Jones, W. R.; Jackson, P. E.: Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples, *Journal of Chromatography A* **546**, 411-421 (1991).
- 69 Křížek, T.; Breitbach, Z. S.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.; Coufal, P.: Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono – and dicationic reagents, *Electrophoresis* **30**, 3955-3963 (2009).

-
- 70 Harrold, M.; Stillian, J.; Bao, L.; Rocklin, R.; Avdalovic, N.: Capillary electrophoresis of inorganic anions and organic acids using suppressed conductivity detection Strategies for selectivity control , *Journal of Chromatography A* **717**, 371-383 (1995).
- 71 Moreno, M. V. G.; Jurado, C. J.; Barroso, C. G.: Determination of Ogranic Acids by capillary Electrophoresis with Simultaneous Addition of Ca and Mg as Complexing Agents, *Chromatographia* **57**, 185-189 (2003).
- 72 Chiari, M.; Dell'Orto, N.; Casella, L.:separation of organic acids by capillary zone electrophoresis in buffers containing divalent metal cations, *Journal of Chromatography A* **745**, 93-101 (1996).
- 73 Schwer, K.; Kenndler, E.: Electrophoresis in fused_silica Capillaries: The Influence of Organic Solvents on the Electroosmotic Velocity and the Zeta Potential, *Analytical Chemistry* **63**, 1801-1807 (1991).
- 74 Mato, I.; Huidobro, J. F.; Simal-Lozano, J.; Sancho, M. T.: Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis, *Analytica Chimica Acta* **565**, 190-197 (2006).
- 75 Vaz, F. A. S.; Silva, P. A.; Passos, L. P.; Heller, M.; Micke, G. A.; Costa, A. C. O.; Oliveira, M. A. L.: Optimisation of a Capillary Zone Electrophoresis Methodology for Simultaneous Analysis of Organic Aliphatic Acids in Extracts of *Brachiaria brizantha*, *Phytochemical Analysis* **23**, 569-575 (2012). *CA* **158**:236853.
- 76 Castiñeira, A; Peña, R. M.; Herrero, C.; García-Martin, S.: Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: optimization with five different background electrolytes, *Journal of High Resolution Chromatography* **23**, 647-652 (2000).
- 77 Saavedra, L.; Garcia, A.; Barbas, C.: Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice, *Journal of Chromatography A* **881**, 395-401 (2000).

-
- 78 Dabek-Zlotorzynska, E.; Dlouhy, J. F.: Capillary zone electrophoresis with indirect UV detection of organic anions using 2,6-naphthalenedicarboxylic acid, *Journal of Chromatography A* **685**, 145-153 (1994).
- 79 Soga, T.; Ross, G. A.: Capillary electrophoresis determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: effect of electrolyte's complexing ability, *Journal of chromatography A* **767**, 223-230 (1997).
- 80 Padaruskas, A.; Olšauskaitė, V.; Schwedt, G.: Simultaneous separation of inorganic anions and cations by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **800**, 369-375 (1998).
- 81 Galli, V.; García, A.; Saavedra, L.; Barbas, C.: Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples, *Electrophoresis* **24**, 1951-1981 (2003).
- 82 Soga, T.; Imaizumi, M.: Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds, *Electrophoresis* **22**, 3418-3425 (2001).
- 83 Soga, T.; Ross, G. A.: Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **837**, 231-237 (1999).
- 84 Castiñeira, A.; Peña, R. M.; Herrero, C.; García-Martin, S.: Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection, *Journal of Food Composition and Analysis* **15**, 319-331 (2002).
- 85 Kaniansky, D.; Zelenská, V.; Baluchová, D.: Capillary zone electrophoresis of inorganic anions with conductivity detection, *Electrophoresis* **17**, 1890-1897 (1996).
- 86 Klampfl, C. W.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W.; Basener, N.: Determination of low-molecular-mass ionic compounds in electrodeposition coatings by capillary electrophoresis with conductivity detection, *Journal of Chromatography A* **804**, 357-362 (1998).

87 Tůma, P.; Samcová, E.; Štulík, K.: Determination of the spectrum of low molecular mass organic acids in urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet photometric detection—An efficient tool for monitoring of inborn metabolic disorders, *Analytica Chimica Acta* **685**, 84-90 (2011).

88 Gaš, B.: *PeakMaster 5.3* [on-line]. Dostupné z URL:
<<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> [cit. 6.8.2013]

89 Vasovic, D. D.; Stojakovic, D. R.: Preparation and properties of some amorphous chromium(III) phosphates, *Journal of Non-Crystalline Solids* **109**, 129-132 (1989).

90 Nelson, B. C.; Uden, P. C.; Rockwell, G. F.; Gorski, K. M.; Aguilera, Z. B.: Determination of oxalate in parenteral nutrition solutions by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **771**, 285-299 (1997).